

**UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN NACHWEIS
DES SPRING VIREMIA OF CARP VIRUS IN
ZELLKULTUREN UND IN KARPFGEGEWEBEN
MIT DER IMMUNOPEROXIDASE-
UND IMMUNOFLUORESCENZTECHNIK**

Mohamed Faisal Abdelkariem-Hussein

1982

Aus dem Institut für
Zoologie und Hydrobiologie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Vorstände: Prof. Dr. M. Ruf, Prof. Dr. R. Hoffmann

Angefertigt unter Leitung von:
PD Dr. rer. nat., Dr. med. vet. habil. W. Ahne

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN
NACHWEIS DES SPRING VIREMIA OF CARP VIRUS
IN ZELLKULTUREN UND IN KARPFGEGEWEBEN
MIT DER
IMMUNOPEROXIDASE- UND IMMUNOFLUORESZENZTECHNIK

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Mohamed Faisal Abdelkariem - Hussein
aus
Kairo/Ägypten

München 1982

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. G. Terplan
Referent: Prof. Dr. Dr.habil. W. Ahne
Korreferent: Prof. Dr. DDr.h.c. A. Mayr

Tag der Promotion: 30. Juli 1982



Druck: Dissertationsdruck Novotny jr., 8135 Söcking/Starnberg

Meiner Frau
in Liebe
und Dankbarkeit

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG	1
II. SCHRIFTTUM	3
1. Allgemeines	3
2. Die Frühjahrsvirämie der Karpfen (<u>Cyprinus carpio</u>) (Spring Viremia of Carp, SVC)	4
2.1. Eigenschaften des Spring Viremia of Carp Virus (SVCV)	4
2.2. Krankheitsbild und Pathogenese der SVC	5
2.3. Epizootiologie der SVC	6
2.4. Verbreitung und Wirtsspektrum des SVCV	7
2.5. Diagnose der SVC	8
2.6. Bekämpfung der SVC	9
3. Das hämatopoetische Gewebe der Fische und Virusinfektion	10
4. Serologische Nachweismethoden für Fischviren	11
4.1. Herstellung von Antiserum gegenüber Fischviren	11
4.2. Bisher angewandte serologische Nachweismethoden für Fischrhabdoviren	12
4.2.1. Neutralisationstest (NT)	13
4.2.2. Immunofluoreszenztechnik (IFT)	15
4.2.3. Immunoperoxidase-Technik (IPT)	20
4.2.4. Vergleich zwischen der IFT und der IPT	23
III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	27
1. Material und Methoden	27
1.1. Zellkulturen	27
1.2. Virusmaterial	27
1.3. Virustitration	28
1.4. Serumneutralisationstest	28

	Seite
1.5. Herstellung von SVCV-Antiserum	29
1.5.1. Kaninchenimmunisierung	29
1.5.2. Behandlung des Immunserums mit Gewebepulver	29
1.5.3. Gewinnung der anti-SVCV-Immunglobulin (IgG)-reichen Fraktion des Serums	30
1.6. Nachweis des SVCV-Antigens in Zellkulturen mittels Immunofluoreszenz und Virustitration	31
1.6.1. Virustitration	31
1.6.2. Indirekte Immunofluoreszenz (IF)	31
1.7. SVCV-Antigennachweis in Zellkulturen mit Hilfe der Immunoperoxidasetechnik	33
1.8. SVCV-Antigennachweis in Karpfengeweben	33
1.8.1. Versuchsfische	33
1.8.2. Infektion von Karpfen über das Wasser	34
1.8.3. Virusisolierung	34
1.8.4. Herstellung von Gewebeschnitten	34
1.8.5. SVCV-Antigennachweis in Gefrierschnitten mit der indirekten IF-Methode	35
1.8.6. Nachweis der endogenen Peroxidase in Fischgeweben	35
1.8.7. Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivitäten in Karpfengeweben	35
1.8.8. SVCV-Antigennachweis in Gewebeschnitten mit der indirekten IP-Methode	36
2. Ergebnisse	37
2.1. Immunserumherstellung	37
2.2. Nachweis von SVCV-Antigen in Zellkulturen mittels IFT und IPT	37

	Seite
2.2.1. Ergebnisse der IFT	38
2.2.2. Ergebnisse der IPT	38
2.3. Titration infizierter Karpfengewebe mit der IFT, der IPT, der Plaquemethode und im Mikrotitersystem	42
2.4. Nachweis endogener Peroxidaseaktivitäten (EPA) in der Leber, der Milz und der Niere von Karpfen	46
2.5. Blockierung der EPA im Fischgewebe	46
2.6. Nachweis des SVCV-Antigens in Gefrier- schnitten infizierter Karpfenorgane mit der IFT und IPT	49
IV. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE	57
1. Immunserumherstellung	57
2. Nachweis von SVCV-Antigen in Zellkulturen mittels IFT bzw. IPT	58
3. Titration infizierter Karpfengewebe mit der IFT, IPT, Plaquemethode und im Mikrotiter- system	59
4. Blockierung der EPA in Fischgeweben	61
5. Nachweis des SVCV-Antigens in Gefrierschnitten infizierter Karpfenorgane mit IFT und IPT	62
V. ZUSAMMENFASSUNG	64
VI. SUMMARY	65
VII. LITERATURVERZEICHNIS	66

I. EINLEITUNG

In Entwicklungsländern, wo ein besonders großer Mangel an tierischem Eiweiß herrscht, wird infolge der steigenden Nahrungsfischnachfrage neben anderen Fischarten insbesondere der Karpfen, wegen seines schnellen Wachstums, der guten Futterverwertung und der relativ hohen Widerstandsfähigkeit in zunehmendem Maße kultiviert. Auch in meinem Heimatland Ägypten findet der Karpfen als Proteinlieferant immer mehr Beachtung und man beginnt durch intensive Kultivierungsmethoden die Karpfenproduktion zu steigern. Intensiv betriebene Aquakulturen sind aber durch eine Reihe von Krankheitserregern gefährdet.

Eine der verlustreichsten Karpfenkrankheiten ist die Frühjahrsvirämie, die durch das Spring Viremia of Carp Virus (SVCV) verursacht wird (FIJAN et al., 1971). Diese Krankheit ist in Europa und vermutlich auch in anderen Ländern verbreitet.

Das SVCV wird in der Routinediagnostik in der Regel isoliert und durch Neutralisation identifiziert, ein Vorgang, der 1 bis 2 Wochen bis zum Vorliegen der Befunde in Anspruch nimmt. Die SVCV-Diagnostik wird häufig dadurch erschwert, daß das Virus nicht bei allen Krankheitsphasen isoliert werden kann (AHNE und WOLF, 1980).

Mit Hilfe der Immunofluoreszenztechnik (IFT) gelang es, Fischvirusantigene (Virus der hämorrhagischen Sepsis der Forellen, Channel Catfish Virus), trotz negativer Isolierungsversuche in Fischgeweben nachzuweisen (JØRGENSEN und MEYLING, 1972; PLUMB et al., 1981). Da die IFT für die SVCV-Diagnose in der Literatur bisher nicht dokumentiert ist, wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, den Erreger in infizierten Zellkulturen und Fischgeweben mit der IFT nachzuweisen.

Weiterhin wurde der Versuch unternommen, mit der Immunoperoxidasetechnik (IPT) den zellulären SVCV-Antigen-nachweis zu erbringen. Infolge der einfachen Handhabung und der hohen Empfindlichkeit der IPT sowie wegen der Verwendung eines einfachen Lichtmikroskopes zur Diagnostik, scheint diese Technik besonders für Entwicklungsländer, wo Fluoreszenzmikroskope häufig nicht in ausreichender Anzahl vorhanden sind, geeignet. Aus diesem Grunde versucht auch die Weltgesundheitsorganisation seit Jahren, die IPT für die virologische Routinediagnostik in diesen Ländern einzuführen (WHO, 1978).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher,

- a) die Brauchbarkeit der IPT für den routinemäßigen SVCV-Nachweis zu überprüfen;
- b) die mit der IPT erarbeiteten Ergebnisse mit denen der IFT und mit der Virusisolierung zu vergleichen.

II. SCHRIFTTUM

1. Allgemeines

In den letzten 20 Jahren wurden bei Fischen eine Reihe von Viruserkrankungen diagnostiziert. Von den 32 bei Teleosteen bisher ermittelten Viren oder virusähnlichen Partikeln gehören 8 der Rhabdovirusgruppe an (Tab. 1).

Tabelle 1: Fischpathogene Rhabdoviren (zitiert nach AHNE und WOLF, 1980)
x JENSEN et al. (1979)
xx MALSBERGER und LAUTENSLAGER (1980)

Virus	Größe in nm	natürliche Wirte	Vorkommen
Virus der hämorrhagischen Septikämie der Forellen (VHSV)			
VHSV Typ 1	60-70x180	Regenbogenforellen, Hechte, Äschen	Europa
VHSV Typ 2		Regenbogen-, Bachforellen	Dänemark
VHSV Typ 3		Bachforellen	Frankreich
Virus der infektiösen hämatopoetischen Nekrose (IHNV)	65x150-190	Regenbogenforellen, Lachse	Nordamerika, Japan
Eel Virus American (EVA)		Aale	Japan
Eel Virus European (EVE)		Flußaale	Japan
Spring Viremia of Carp Virus (SVCV)	60-80 x 140-180	Karpfen	Europa
Pike Fry Rhabdovirus (PFR)	60-90 x 125-160	Hechte, Grasfische, Schleien	Holland Deutschland
Gadus-Isolat ^x		Dorsch	Dänemark
Cichlasoma-Isolat ^{xx}		Perlcichliden	USA

Rhabdovirusinfektionen rufen insbesondere bei kultivierten Fischen (Aale, Forellen, Hechte, Karpfen) hohe Morbiditäts- und Mortalitätsraten hervor. In Europa sind vor allem Forellen (Salmonidae) durch die virale hämorrhagische Septikämie, Hechte (Esocidae) durch die Pike Fry Rhabdovirus Disease und Karpfen (Cyprinidae) durch die Frühjahrsvirämie, gefährdet.

2. Die Frühjahrsvirämie der Karpfen (Cyprinus carpio) (Spring Viremia of Carp, SVC)

Die Frühjahrsvirämie ist in europäischen Karpfenteichwirtschaften weit verbreitet. Durch diese Viruskrankheit werden der heute allgemein intensivierten Karpfenproduktion erhebliche Verluste zugefügt.

2.1. Eigenschaften des Spring Viremia of Carp Virus (SVCV)

Das Spring Viremia of Carp Virus (SVCV) besitzt die geschoßförmige Morphologie der Rhabdoviren und hat die Dichte von 1,195 - 1,200 g/cm³ CsCl. Elektronenmikroskopisch wurde eine Virusgröße von 140 - 180 x 60 - 80 nm ermittelt. Das SVCV ist äther-, säure- und hitzelabil (FIJAN et al., 1971; AHNE, 1973; BACHMANN und AHNE, 1973). Der Erreger besitzt Einzelstrang-RNS und eine RNS-abhängige Polymerase (Transkriptase), deren optimale Aktivität bei 20 - 22°C liegt (BISHOP und SMITH, 1977). Das behüllte Virus besitzt 5 Strukturproteine, die denen des PFR ähneln, sich aber von den Strukturproteinen des VHSV und des IHNV unterscheiden. Ferner sind Übereinstimmungen hinsichtlich der Strukturproteinzusammensetzung mit den Rhabdoviren vom Prototyp des Vesikulären Stomatitis Virus festgestellt worden (HILL et al., 1975).

Zwischen den bisher isolierten Fischrhabdoviren und dem SVCV besteht keine eindeutige serologische Verwandtschaft. Das SVCV vermehrt sich im Zytoplasma verschiedener Fischzellen sowie in Reptilien- und Warmblüterzellen; die optimale Replikationstemperatur liegt bei 20 - 22°C. Das Virus induziert in infizierten, permissiven Zellkulturen zytopathische Effekte (CPE) bestehend aus diffuser rundzelliger Zelldegeneration mit nachfolgender Lysis der Zellen innerhalb 24 - 36 Stunden post infectionem (p.i.). Bereits 6 - 8 Stunden kann bei infizierten, mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten Fathead minnow (FHM)-Zellen (GRAVELL und MALSBERGER, 1965) eine deutliche Kernwandhyperchromasie beobachtet werden. Ein Replikationszyklus des Erregers dauert in FHM-Zellen bei 20 - 22°C 8 - 9 Stunden (AHNE, 1973).

2.2. Krankheitsbild und Pathogenese der SVC

Experimentell infizierte oder natürlich akut erkrankte Karpfen zeigen eine entzündete Afterpapille, intensive Defäkation mit Darmschleimhautabgängen sowie Dunkelfärbung der Haut, mehr oder weniger stark ausgeprägten Exophthalmus sowie petechiale Hautblutungen. Bei der Sektion fallen Aszites, Peritonitis, katarrhalische oder hämorrhagische Enteritis, ödematisierte Organe, sowie Petechien in Leber, Niere und Herz auf. In manchen Fällen treten auch in der inneren Schwimmblasenwand, in der Muskulatur und in den Kiemen Blutungen auf.

Histopathologische Veränderungen wurden in Leber, Milz, Niere, Gehirn und Schwimmblase festgestellt. Das Krankheitsbild gleicht im allgemeinen einer ausgeprägten hämorrhagischen Diathese (NEGELE, 1977; STANKIEWICZ, 1977; BUCKE und FINLAY, 1979).

Aufgrund virologischer Untersuchungen werden Leber, Milz und Niere als Targetorgane angesehen (AHNE, 1978a; BAUDOUY et al., 1980a).

Nach AHNE (1978a) beträgt die Inkubationszeit bei experimenteller Infektion über das Wasser (13°C) 7 Tage. FIJAN et al. (1971) gaben Inkubationszeiten unter natürlichen Bedingungen zwischen 15 und 60 Tagen an.

Bei der SVC handelt es sich um eine zyklisch verlaufende Infektionskrankheit der Karpfen mit 2 deutlich am 6. und 10. Tag p.i. ausgeprägten virämischen Phasen. Die Organmanifestation erfolgt bei einer Wassertemperatur von 13°C 7 Tage nach Infektion (AHNE, 1978a).

Werden SVCV-infizierte Karpfen bei einer Wassertemperatur von über 15°C gehalten, so tritt die Krankheit gewöhnlich nicht auf. Die Fische bilden dann vielmehr humorale Antikörper, die eine Virusausbreitung im Fisch zum Erliegen bringen. Derartig immunisierte Fische erwiesen sich gegenüber einer Reinfektion als resistent (AHNE, 1980).

2.3. Epizootiologie der SVC

Wie der Name "Frühjahrsvirämie" schon sagt, tritt die Krankheit vor allem im Frühjahr auf, da die aus der Überwinterung kommenden Karpfen zu dieser Zeit nur über geringe Abwehrkräfte verfügen (FIJAN, 1976; AHNE und WOLF, 1980). Das Virus kann durch Kontakt, über das Wasser und möglicherweise mit dem Ei übertragen werden (AHNE, 1979). Nach einer experimentellen Untersuchung erfolgt die Ansiedlung des Erregers bei einer Infektion über das Wasser in den Kiemen, wo auch eine erste Virusvermehrung stattfindet (AHNE, 1978a; BAUDOUY et al., 1980a; 1980b). Fischparasiten (Argulus foliaceus, Piscicola geometra) dienen ebenfalls der Virusübertragung (PFEIL-PUTZIEN und BAATH, 1978; AHNE, 1979). Von infizierten Fischen wird der Erreger mit dem Kot über mehrere Wochen hinweg ausgeschieden (AHNE, 1978a; PFEIL-PUTZIEN und BAATH, 1978; BAUDOUY et al., 1980a; 1980b).

2.4. Verbreitung und Wirtsspektrum des SVCV

Die Frühjahrsvirämie ist in Europa weit verbreitet. Das SVCV wurde in Jugoslawien (FIJAN et al., 1971), in der Bundesrepublik Deutschland (AHNE, 1973), in Frankreich (BAUDOUY, 1975), in Österreich (KÖLBL, 1975), in der Sowjetunion (ROUDIKOV et al., 1975), in der Tschechoslowakei (TESARCIK et al., 1977), in Großbritannien (BUCKE und FINLAY, 1979) und in Italien (GHITTINO et al., 1980) bisher isoliert. Seroepizootiologische Untersuchungen in Österreich und Deutschland weisen auf einen hohen Durchseuchungsgrad der Karpfenbestände hin. Bei 19 von 20 (95%) untersuchten österreichischen Karpfenteichwirtschaften wurden SVCV-neutralisierende Antikörper nachgewiesen (KÖLBL und KAINZ, 1977). In Bayern erwiesen sich 51 von 59 (86%) der untersuchten Karpfenteichwirtschaften als seropositiv (WIZIGMANN et al., 1980).

Karpfen (Cyprinus carpio) aller Altersklassen können als die eigentlichen Wirtsfische für das SVCV angesehen werden. Während SVC-Ausbrüchen sterben aber neben Karpfen auch andere Cypriniden, z.B. Karauschen und verschiedene Weißfische (FIJAN, 1978).

Der Erreger konnte bisher auch bei Karauschen (KÖLBL, 1975) und Silberfischen (Hypophthalmichthys molitrix), (ROUDIKOV et al., 1975) nachgewiesen werden. Experimentell sind Guppies (Poecilia reticulata), (BACHMANN und AHNE, 1973); Hechte (Esox lucius), (De KINKELIN et al., 1973); Graskarpfen (Ctenopharyngodon idella), (FIJAN, 1976) und Sonnenbarsche (Centrarchidae), (Zit. nach FIJAN, 1978) virusempfindlich.

2.5. Diagnose der SVC

Epizootiologische, klinische, pathologisch-anatomische und histologische Befunde können als Hinweise für das Vorliegen der SVC dienen.

Die Diagnostik von Virusinfektionen basiert in der Regel auf der Isolierung und Identifizierung des Erregers. Für die Virusisolierung eignen sich innere Organe der infizierten Karpfen, die aber unterschiedliche Virustiter aufweisen können (Tab. 2). Das Virus tritt auch im Blut periodisch gehäuft auf und kann dort direkt nachgewiesen werden (AHNE, 1978a; BAUDOUY et al., 1980a).

Die Virusisolierung erfolgt im allgemeinen nach Standardmethoden (MAYR et al., 1974) unter Verwendung von FHM-Zellen bei einer Inkubationstemperatur von 20°C (AHNE und WOLF, 1980). Der Erreger wird durch serologische Methoden (Serumneutralisationstest, Immunofluoreszenz) identifiziert.

Tabelle 2: SVC-Virustiter in verschiedenen Organen infizierter Karpfen

Organe	Virusmenge ($\log_{10} \text{KID}_{50}/\text{g}$)	
	A) Natürliche Infektion	B) Experimentelle Infektion
Leber	6,5	6,8
Milz	3,8	5,5
Niere	5,8	5,2
Gehirn	4,3	4,5
Kiemen	3,5	3,5 ^x

A) FIJAN et al. (1971)

B) AHNE (1973; 1978a)

x $\log_{10} \text{PFU/g}$

Die Krankheitsphase der Fische hat auf den Erregernachweis einen Einfluß (Tab. 3).

Tabelle 3: Nachweis von Fischviren in Abhängigkeit vom Krankheitsstadium (nach AHNE und WOLF, 1980)

Erkrankungsphase	Nachweis von Virus
Inkubationszeit	sehr selten
Prodromalstadium	gelegentlich
Beginn der Erkrankung	häufig
Akute Phase	häufig
Späte Phase	selten
Rekonvaleszenz	sehr selten
Chronische Phase	sehr selten

2.6. Bekämpfung der SVC

SVC-Krankheitsausbrüche können verhindert bzw. reduziert werden, wenn die Karpfen bei Wassertemperaturen von über 15°C gehalten werden. Bei einem akuten SVC-Ausbruch kann die erwähnte Temperaturerhöhung (2.2) den Krankheitsverlauf durch Ausbildung von Interferon (BAUDOUY, 1978) und Antikörpern (AHNE, 1980) stoppen. Zur Prophylaxe werden allgemeine seuchenhygienische Maßnahmen, Nutzung von Quellwasser und Verwendung von SVCV-freien Besatzmaterial empfohlen (AHNE und WOLF, 1980).

Obwohl einige Erfolge bei der Immunisierung der Karpfen mit SVCV erzielt worden sind (FIJAN et al., 1977; AHNE, 1980; FIJAN, und MATAŠIN, 1980), konnte ein praxisreifer Impfstoff gegen das SVCV bisher noch nicht eingesetzt werden.

3. Das hämatopoetische Gewebe der Fische und Virusinfektion

Das hämatopoetische Gewebe der Teleosteer befindet sich hauptsächlich in der Kopfniere (Pronephros), zwischen den Tubuli der exkretorischen Niere (Mesonephros) sowie in der Milz, in der Thymusdrüse und zum Teil in der Leber und im Darm (ELLIS, 1978). In der Niere und Milz bilden die Melanomakrophagen Zentren, die bei den Abwehrmechanismen der Fische eine Rolle spielen (ROBERTS, 1975). So wurde festgestellt, daß antigenbeladene, zirkulierende Makrophagen zu den Melanomakrophagen-Zentren immigrieren (FERGUSON, 1976).

Bei verschiedenen Virusinfektionen der Fische wurde eine histopathologische Veränderung der hämatopoetischen Gewebe (vor allem in der Niere) beobachtet (YASUTAKE, 1975).

Die IHN nimmt ihren Ausgang vom hämatopoetischen Gewebe der Niere und geht auf die Milz, Leber und das Pankreas über (YASUTAKE, 1975).

Bei der VHS wurde nach virologischen, histologischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen die Niere bzw. die Kopfniere als Zielorgan betrachtet (YASUTAKE und RASMUSSEN, 1968; AMLACHER et al., 1980). Danach erfolgt eine Virusausbreitung auf die Milz, Leber und das Pankreas. AMLACHER et al. (1980) berichteten über extensive Degenerationen der Melanomakrophagen und des hämatopoetischen Gewebes der Kopfniere nach VHS-Infektionen.

Bei der PFR-Erkrankung sind die histopathologischen Veränderungen des hämatopoetischen Gewebes in der Niere, Milz und Leber das Hauptmerkmal der Krankheit (BOOTSMA und VAN VORSTENBOSCH, 1973; BOOTSMA, 1976).

Bei der Channel Catfish Virus (CCV)-Erkrankung wurde die Niere, in der der höchste Infektionstiter (10^7 PFU/ml) gefunden wurde, als Targetorgan des CCV betrachtet (WOLF et al., 1972). Die ersten histopathologischen Veränderungen wurden im hämatopoetischen Gewebe der exkretorischen Niere der mit CCV infizierten Katzenwelse diagnostiziert (WOLF et al., 1972).

4. Serologische Nachweismethoden für Fischviren

4.1. Herstellung von Antiserum gegenüber Fischviren

Antiseren gegenüber Fischviren sind für diagnostische Zwecke und für die Forschung unentbehrliche Hilfsmittel. Die Identifizierung von Virusisolaten, die Unterscheidung von Sero- und Subtypen oder der Antigennachweis in infizierten Zellen und Geweben kann nur unter Verwendung spezifischer Antiseren erfolgen. Für verschiedene serologische Methoden wie die Immunofluoreszenz, die Immunoperoxidasereaktion oder die Komplementbindung müssen die Antiseren einen entsprechend hohen Antikörpergehalt aufweisen, um eine klare Aussage machen zu können. Die Schwierigkeit liegt, wie die Erfahrung zeigt darin, hochtitrige Antiseren gegenüber Fischviren zu erhalten.

Immunseren gegenüber fischpathogenen Rhabdoviren können in homologen (Fische) oder heterologen Systemen (Warmblüter) mit pelletierten und über Gradienten (Sucrose) gereinigten Viruspräparationen hergestellt werden (AHNE, 1978b). Im allgemeinen stellen bei Rhabdoviren die G-Proteine (Glykoproteine der Virusoberflächenprojektionen) das Hauptantigen, das für die neutralisierenden Aktivitäten und die Typenspezifität des Antiserums verantwortlich ist (CARTWRIGHT et al., 1970; KANG und PREVEC, 1970; KELLEY et al., 1972).

Obwohl die Immunserumherstellung in verschiedenen Tieren (Kaninchen, Ziege, Schwein) gegenüber VHSV mehr oder weniger erfolgreich versucht wurde (HABASHI et al., 1975), verwendet man routinemäßig Kaninchen zur Herstellung von Hyperimmunseren gegenüber Fischviren, da hiermit im allgemeinen reproduzierbare Ergebnisse erwartet werden können (HILL et al., 1981). Im Gegensatz zum IPNV erhält man aber mit Rhabdoviren gewöhnlich nur geringtitrige Immunseren in Kaninchen (Tab. 4), (HILL et al., 1981).

Tabelle 4: Neutralisationstiter von in Kaninchen hergestellten Antiseren gegenüber IPNV und 4 Fischrhabdoviren (SVCV, PFR, VHSV, IHNV), (HILL et al., 1981)

Immunisierung	Antiserum gegenüber				
	IPNV	SVCV	PFR	VHSV	IHNV
1 x i.m. + 1 x i.v.	360 000*	325	540	100	320
1 x i.m. + 2 x i.v.	2 650 000	6 500	200	2 300	1 700

*: reziproker Wert der Serumverdünnung mit 50% Plaquereduktion

HILL et al. (1981) empfehlen die kombinierte (i.m. + Freund'sches Adjuvans; i.v. ohne Adjuvans) Impfmethode (3wöchige Immunisierung) zur Herstellung von Fischvirusantisera in Kaninchen.

4.2. Bisher angewandte serologische Nachweismethoden für Fischrhabdoviren

Serologische Methoden werden für den Nachweis von Virusantigenen bzw. Antikörpern verwendet. In der Routine sind der Neutralisationstest (NT) und die direkte bzw. indirekte Immunofluoreszenztechnik (IFT) die am meisten verwendeten serologischen Methoden, obwohl andere Techniken (Immunoperoxidase (IP), Komplementbindungsreaktion (KB) Hämagglutination (HA), Immunelektrophorese (I-Phor), Immunodiffusion (ID) und Immunelektronenmikroskopie (IE) zur Verfügung stehen. Jede Methode hat ihre Vorteile für ein bestimmtes Anwendungsgebiet. Tabelle 5 faßt die verschiedenen serologischen Nachweismethoden, die z.Z. in der Diagnostik von Fischviren verwendet werden, zusammen.

Tabelle 5: Gegenwärtig in der Fischvirologie verwendete serologische Nachweismethoden (zitiert nach AHNE, 1981)

Erregernachweis	Nachweis von Antikörpern im Fischserum	Erreger	Virusgruppe
NT, IF	NT	Channel Catfish Virus (CCV)	Herpes
NT, IF		Herpesvirus salmonis	
NT, IF, HA	NT	Virus der infektiösen hämopoetischen Nekrose (IHNV)	Rhabdo
NT, IF, IP, KB, ID	NT, IF	Virus der hämorrhagischen Septikämie der Forellen (VHSV)	
NT, IF, IP, ID, HA	NT, HA	Spring Viremia of Carp Virus (SVCV)	
NT, I-Phor	NT	Pike Fry Rhabdovirus (PFR)	
NT		Aalrhabdoviren	
NT, IF, IP, KB, HA	NT	Virus der infektiösen Pankreasnekrose (IPN)	Birna

4.2.1. Neutralisationstest (NT)

Der Neutralisationstest ist eine der zur Zeit am weitesten verbreiteten Methoden zur Identifizierung von Fischrhabdoviren und zum Nachweis von viruspezifischen Serum-Antikörpern. Neutralisationsteste werden gewöhnlich mit konstanter Virusmenge (50 - 100 KID₅₀, PFU) und steigenden Serumverdünnungen (2er Potenzen) oder mit konstanter Serumverdünnung (abhängig vom Antikörpergehalt) und in 10er Potenzen verdünnten Virussuspensionen durchgeführt.

Epizootiologische Studien sind unter Verwendung von Neutralisationstesten bisher bei Cypriniden (SVCV-Antikörper), (KÖLBL und KAINZ, 1977; WIZIGMANN et al., 1980), bei Salmoniden (IHN-, IPNV-, VHSV-Antikörper), (AMEND und Smith, 1974; JØRGENSEN, 1974) erfolgreich durchgeführt worden. Komplement-ähnliche Faktoren scheinen bei der Neutralisation des VHSV mit Forellenimmenserum (DORSON und TORCHY, 1979) bzw. bei der PFR-Neutralisation unter Benutzung von Kaninchenimmenserum (CLERX et al., 1978) eine Rolle zu spielen. Auch kann der Erfolg einer Vakzinierung über den Nachweis von neutralisierenden Antikörpern untersucht werden (FIJAN et al., 1977; AHNE, 1980; FIJAN und MATAŠIN, 1980; JØRGENSEN, 1982).

Obwohl zwischen dem SVCV, dem PFR und dem IHNV geringgradige Kreuzreaktionen festgestellt wurden, werden diese Viren sowie das VHSV als serologisch unterschiedliche Erreger betrachtet (HILL et al., 1975), (Tab. 6).

Mit Hilfe des NT wurde zwischen 3 VHSV (JØRGENSEN, 1972; De KINKELIN und Le BERRE, 1977) und 3 IPNV-Subtypen (UNDERWOOD et al., 1977) unterschieden.

Tabelle 6: Kreuzneutralisation von 4 Fischrhabdoviren (SVCV, PFR, IHNV, VHSV), (nach HILL et al., 1975)

Antiserum	V i r u s			
	SVCV	PFR	IHNV	VHSV (Typ 1)
SVCV	6500 ^x	20	20	10
PFR	33	200	27	10
IHNV	25	27	1700	10
VHSV (Typ 1)	10	10	10	2300

x : reziproker Wert der Antiserumverdünnung) mit 50%
Plaquereduktion

Ein Vorteil des Neutralisationstestes gegenüber anderen serologischen Techniken liegt vor allem in der hohen Spezifität. So war es z.B. möglich, mit Hilfe des kinetischen NT, 12 serologisch nahestehende IPNV-Isolate voneinander zu unterscheiden (NICHOLSON und POCHEBIT, 1981). Der NT findet aber eine Beschränkung darin, daß er nur in lebenden Systemen (Zellen, Versuchstiere) durchgeführt werden kann (MAYR et al., 1977)

Die Anwesenheit von defekten interferierenden Partikeln sowie Wirtszellfunktionen der zur Antiserumherstellung verwendeten Antigene können die Ergebnisse eines Kreuzneutralisationstestes beeinflussen. Im übrigen kann der NT den Nachweis über die Lokalisierung des Virus in Fischgeweben oder Zellen nicht erbringen (AHNE, 1981).

4.2.2. Immunofluoreszenztechnik (IFT)

Die Immunofluoreszenz ist eine wichtige Methode der diagnostischen Virologie und der virologischen Forschung.

Diese Methode basiert auf dem Nachweis von Virusantigenen mittels fluorchrommarkierter Antikörper, die durch ultraviolettes Licht sichtbar (Fluoreszenz) gemacht werden. Die IFT ermöglicht einen schnellen, direkten Antigennachweis in Geweben (APPEL, 1969; CHEVILLE und MENGLING, 1969; FISCHMAN und SCHÄFFER, 1971) und in den Zellkulturen (COONS und KAPLAN, 1950; REDA et al., 1964).

Nach MAYR et al. (1977) wird die IFT hauptsächlich für die intrazelluläre Lokalisierung von Virusantigenen, für Untersuchungen des zeitlichen Ablaufes von Virusinfektionen und der Bildung von verschiedenen Virusantigenen, den Nachweis defekter Viruspartikel oder Infektionen mit nicht zytopathogenen Virusarten sowie für die Untersuchung der Pathogenese von Virusinfektionen eingesetzt.

Prinzipiell unterscheidet man 2 IF-Techniken:

- a) Die direkte Methode, bei der der virale Antikörper direkt mit dem Fluorochrom markiert wird.
- b) Die indirekte Methode, wobei die Antikörper, die gegen die Immunglobuline der Tierart gerichtet sind, von der das virusspezifische Antiserum her stammt, mit fluoreszierenden Stoffen gekoppelt werden.

Wegen der Einsparung von virusspezifischen Immunsereum, der Möglichkeit fluorochromkonjugierte Speziesimmunglobulin-Antikörper zu kaufen und wegen der höheren Empfindlichkeit (ESPMARK et al., 1971) wird die indirekte IFT häufig bevorzugt. Fischvirusantigene (Tab. 7) sind sowohl mit der direkten als auch mit der indirekten IF-Methode in infizierten Zellkulturen nachgewiesen worden.

Über den Nachweis und Verteilung von Fischrhadovirusantigenen in Fischgeweben liegen bis jetzt nur wenige Informationen vor.

JØRGENSEN und MEYLING (1972) konnten mittels der direkten IFT das VHSV-Antigen in Gefrierschnitten von Milz, Niere, Leber und Herz akut an VHS erkrankter Forellen nachweisen.

Die Autoren verglichen die IF-Befunde mit den Ergebnissen der Virusisolierung (80 Proben von 20 kranken Forellen) und stellten fest, daß trotz hoher infektiöser Virustiter die Fluoreszenz der untersuchten Gewebe nicht immer positiv war. Andererseits waren einige IF-positive Gewebeproben bei der Virusisolierung negativ. (Tab. 8, 9).

Bei chronischen VHS-Fällen konnten JØRGENSEN und MEYLING (1972) das Virus aus Milz, Herz, Niere und Leber trotz negativer IF dieser Organe, isolieren (Tab. 8). In der Tabelle 9 werden die infektiösen Virustiter der 20, von 5 akuten Fällen abstammenden Gewebeproben mit den IF-Ergebnissen verglichen.

Tabelle 7: Antigennachweis einiger Fischviren durch IFT in Zellkulturen

Virusgruppe	Antigen	Zellen	Animpfdosis	IF-Methode	Erste IF	Lokalisierung	Autor
Rhabdo	VHSV	RTG-2	10 KID ₅₀ /Zelle	direkte	8 Stunden p.i.	Zytoplasma	2
		PG	1 PFU/Zelle	indirekte	8 Stunden p.i.	Zytoplasma	1
	IHN	CHSE-214	n. e.	indirekte	2 Stunden p.i.	Zytoplasma	3
		FHM	In 10er Potenzen verdünntes SVCV-haltiges Karpfen-gewebehomogenat	direkte	n. e.	Zytoplasma	5
	SVCV	PG	1 PFU/Zelle	indirekte	6 Stunden p.i.	Zytoplasma	1
Birna	IPNV	RTG-2	50 KID ₅₀ /Zelle	direkte	3-4 Stunden p.i.	Zytoplasma	6
		PG	1 PFU/Zelle	indirekte	4 Stunden p.i.	Zytoplasma	1
Orthomyxo	EV-2	FHM	n. e.	indirekte	n. e.	Zytoplasma	4
Herpes	CCV	CCO	n. e.	direkte	4 Stunden p.i.	Zytoplasma	7

- 1) FAISAL und AHNE (1980)
- 2) JØRGENSEN und MEYLLING (1972)
- 3) McALLISTER et al. (1974)
- 4) NAGABAYASHI und WOLF (1975)
- 5) PFEIL (1978)
- 6) PIPER et al. (1973)
- 7) PLUMB und BOWSER (1978)

n.e. : nicht erwähnt
 EV-2 : Eel Virus-2
 CCO : Channel catfish ovary-Zellen
 RTG-2 : Rainbow trout gonads-Zellen

PG : Pike gonads-Zellen
 FHM : Fathead minnow-Zellen
 CHSE-214 : Chinook salmon embryo-Zellen

Tabelle 8: VHS-Virusnachweis in Geweben von 20 Regenbogenforellen durch IFT und Virusisolierung (JØRGENSEN und MEYLING, 1972)

Gewebe		IF positiv		IF negativ	
		Virusisolierung		Virusisolierung	
		pos.	neg.	pos.	neg.
Akute Fälle	Milz	5	1	1	2
	Herz	4	4	1	-
	Niere	6	1	1	1
	Leber	4	2	1	2
Chronische Fälle	Milz	-	-	2	9
	Herz	-	-	3	8
	Niere	-	-	1	10
	Leber	-	-	1	10

Tabelle 9: Vergleich der IF-Ergebnisse und der VHS-Virustiter in Geweben von 5 Forellen (JØRGENSEN und MEYLING, 1972)

Gewebe	Fisch 1		Fisch 2		Fisch 3		Fisch 4		Fisch 5	
	Titer	IF	Titer	IF	Titer	IF	Titer	IF	Titer	IF
Milz	3,5 ^x	-	5,8	+	4,8	+	5,2	+	5,5	+
Herz	4,5	+	4,2	+	4,8	+	2,8	+	2,0	+
Niere	5,5	+	5,2	-	5,8	+	5,5	+	6,2	+
Leber	2,0	-	3,2	-	2,8	+	4,8	+	3,8	+

x : Log₁₀ KID₅₀

- : negativ

+ : positiv

In Abklatschpräparaten von Leber, Milz, Niere und Aszitisflüssigkeit akut an der VHS erkrankter Forellen konnte ENZMANN (1980) mit Hilfe der indirekten IFT das Virusantigen nachweisen.

Weiterhin ist in den Lymphozyten chronisch infizierter Forellen das VHSV-Antigen mittels der IFT ermittelt worden (ENZMANN, 1981). HOFFMANN und WIZIGMANN (1981) haben mit Hilfe der IFT das VHSV-Antigen in den Organen experimentell übers Wasser infizierter Forellen ab dem 3. Tag p.i. nachweisen können.

SWANSON (1981) verfolgte den Verlauf der IPNV-Infektion mit der indirekten IFT in 40, 12 Wochen alten Forellen (2 - 4 cm) nach intraperitonealer Virusinjektion ($2,5 \times 10^5$ PFU/Fisch). 1, 3, 5, 7, 9, 12, 18 und 25 Tage p.i. wurden Gefrierschnitte von je 5 Tieren angefertigt. Der Autor konnte das IPNV-Antigen ab dem 3. Tag eindeutig im Pankreas nachweisen. Im Laufe der Infektion (25 Tage) war das IPNV-Antigen hauptsächlich im Pankreas, selten im Darm, Leber und Niere lokalisiert. Magen, Milz, Kiemen und Muskulatur waren dagegen IF-negativ.

Bei symptomlos mit CCV infizierten Katzenwelsen (Ictaluridae) gelang es PLUMB et al. (1981) mit der indirekten IFT das CCV-Antigen in Gefrierschnitten von Eierstöcken der Fische nachzuweisen, obwohl die Virusisolierung einen negativen Befund erbrachte.

Bei einem Vergleich zwischen der Virusquantifizierung mit der IFT und der Plaquemethode von VHS-infizierten Fischorganen wurde die IF als schnelle, zuverlässige Methode betrachtet, da die Ergebnisse dieser Technik schneller als die der Plaquemethode vorlagen (JØRGENSEN und MEIER, 1975). Nach Arbeiten von TU et al. (1974) ist die IFT für die IPN-Virusquantifizierung ebenfalls geeigneter als die Plaquemethode.

JØRGENSEN (1974) konnte VHS-Antikörper in Forellen mit der indirekten drei-Schicht-IFT (Forellenanti-VHS-Serum, Kaninchenantiforellenimmunoglobulin und FITC-markiertes Schweineantikaninchenimmunoglobulin) nachweisen. Der Autor ermittelte nach einem längeren VHS-Immunisierungsprogramm 7 Monate p.i. fluoreszierende Antikörper im Forellenserum, neutralisierende Aktivitäten traten dagegen erst nach 12 Monaten im Serum auf.

4.2.3. Immunoperoxidase-Technik (IPT)

Die Markierung von Antikörpern mit Enzymen, die hauptsächlich dem Nachweis von Antigen-Antikörper-Komplexen dient, ist seit Jahren u.a. in der Immunhistochemie eingeführt (AVRAMEAS und URIEL, 1966; NAKANE und PIERCE, 1966; 1967; RAM et al., 1966).

Meerrettichperoxidase wird wegen des relativ niedrigen Molekulargewichtes (40 000) sowie wegen der Stabilität während Fixierung-, Färbe- und Einbettungsvorgängen als Markierungsenzym der Wahl betrachtet (KURSTAK, 1971).

Heute werden neben fluorchrommarkierten auch Peroxidase-markierte Immunoglobuline zur Darstellung intrazellulär lokalisierter Antigene (Viren, Enzyme, Hormone, Immunoglobuline u.a.) mit zunehmender Häufigkeit erfolgreich verwendet (STRAUS, 1979). Die gebildeten Antigen-Antikörper-Peroxidase-Komplexe können durch farbstoffproduzierende histochemische Enzymnachweismethoden, wobei in Anwesenheit von Peroxidase und Substrat (H_2O_2) ein Elektronendonator oxidiert wird, sichtbar gemacht werden.

Als Elektronendonator verwendet man z.B. Benzidin; 3,3-Diaminobenzidin (DAB); 3,3', 5,5'-Dimethylbenzidin; 3-Amino-9-Äthylcarbazol; Dianisidin sowie 4-Chloro-1-Naphthol (STERNBERGER, 1979). GRAHAM und KARNOVSKY (1966) haben DAB (unlösliches, braunes Oxidationsprodukt) erstmals bei der IPT erfolgreich eingesetzt. Im Gegensatz zu

3-Amino-9-Äthylcarbazol (rotes Oxidationsprodukt) oder 4-Chloro-1-Naphthol (blaues Oxidationsprodukt) ist das braune Oxidationsprodukt der DAB unlöslich und verbleibt deshalb an der Reaktionsstelle. Heutzutage findet DAB trotz mutmaßlicher Karzinogenität für den histochemischen Peroxidasenachweis häufig Anwendung (STRAUS, 1979).

Wie bei der IFT unterscheidet man zwischen der direkten (an antigenspezifische Antikörper gekoppelte Peroxidase) und indirekten (an Antispeziesglobulin gekoppelte Peroxidase) Immunoperoxidase-Methode zum Nachweis zellulärer Antigene.

STERNBERGER et al. (1970) haben eine Methode (Peroxidase-Antiperoxidase, PAP) entwickelt, wobei in der Tierspezies, in der das antigenspezifische Antiserum hergestellt wurde, ein Antiserum gegen Meerrettichperoxidase produziert wird. Anschließend wird über eine Immunreaktion (Antigen-Immuns-erum-Antispeziesglobuline) ein löslicher Peroxidase-Antiperoxidase-Komplex (PAP) gebildet, der durch weitere Reaktionsschritte sichtbar gemacht wird. Diese Methode soll wesentlich empfindlicher sein als die direkte bzw. die indirekte IPT (STERNBERGER, 1979).

Durch Studien von ABELSON et al. (1969), KURSTAK et al. (1969), LEDUC et al. (1969) und WICKER und AVRAMEAS (1969) wurde die IPT in die Virologie eingeführt. Diese Technik kann zum Nachweis von Virusantigenen in Zellkulturen und in Gewebeschnitten verwendet werden.

So wurden verschiedene tierpathogene Viren wie z.B. das Adenovirus-12 (WICKER und AVRAMEAS, 1969), das Tollwut-virus (ATANASIU et al., 1971); Aviäre Leukämieviren (DOUGHERTY et al., 1972), das TGE-Virus (BECKER et al., 1974), das Maul- und Klauenseuche-Virus (SUTMOLLER und COWAN, 1974), das Virus der Aujeszkyschen Krankheit (ROSZKOWSKI et al., 1978) und das Colorado Zeckenfieber-Virus (DESMOND et al., 1979) mit der IPT in Zellkultur nachgewiesen.

NICHOLSON und HENCHAL (1978) konnten das IPNV-Antigen im Zytoplasma infizierter Forellenzellen (AS-Zellen) 6 - 8 Std. p.i. mit Hilfe der direkten bzw. der indirekten IP-Methode ermitteln. FAISAL und AHNE (1980) haben mittels indirekter IPT das SVCV-, IPNV- und VHSV-Antigen in infizierten PG-Zellkulturen 2, 4 und 8 Stunden p.i. nachgewiesen (Tab. 10).

Tabelle 10: Vergleich des Antigennachweises (SVCV, VHSV, IPNV) mit der IPT und IFT in Zellkulturen (FAISAL und AHNE, 1980)

Virus	Erste positive IPT	Erste positive IFT	Erster CPE
	(Stunden p.i.)		
SVCV	2	6	36
VHSV	8	8	24
IPNV	4	6	36

Der Virusantigennachweis in den Organen mit der IPT wird normalerweise dadurch erschwert, daß endogene Peroxidase in einigen Zellen, wie z.B. in Granulozyten (Kern) bzw. Makrophagen (Zytoplasma), vorhanden ist (BERGMEYER, 1970). Im übrigen wirkt Wasserstoffsuperoxid als Substrat für die Katalase und einige Hämoproteine. Diese endogenen Peroxidaseaktivitäten (EPA) können zu Fehlinterpretationen führen (STERNBERGER, 1979). Der Autor wies darauf hin, daß die EPA in Kryostatgewebeschnitten wesentlich höher sind als in Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Schnitten.

Diese EPA können durch eine Behandlung der Präparate mit verschiedenen Chemikalien beseitigt werden, wobei aber eine Schädigung der Virusantigene nicht immer ausgeschlossen werden kann (GARDNER et al., 1978). So ermittelte z.B.

VAN DUIJN (1957), daß eine Behandlung der Pferde-Erythrozyten mit verdünnter H_2O_2 die EPA zuverlässig inaktiviert. STREEFKERK (1972) beschrieb die Verwendung von absoluten Methanol mit Zusatz von H_2O_2 zur Blockierung der EPA in Gefrierschnitten und in Formalin-fixierten Präparaten von Rattenmilzen.

Nach einer Modifikation der obengenannten Methode gelang es FINK et al. (1979) das New Castle-Virusantigen (NDV) in Gefrierschnitten von Hühner-Lungengewebe nachzuweisen. Da die NDV-Glykoproteine für Methanol empfindlich sind, haben die Autoren die Methanol- H_2O_2 -Behandlung erst nach der antigenspezifischen Immunreaktion durchgeführt. BANKS (1979) inaktivierte innerhalb 5 Minuten die EPA in Tumorgewebe mit einer H_2O_2 -Lösung. Nach Beobachtung von STRAUS (1971) blockiert eine Methanol-1% Nitroferricyanid-1% Essigsäure-Lösung die EPA auch in blutreichen Geweben (Milz, Niere) völlig. Eine Behandlung der Präparate (Lymphknoten von Kaninchen und Nieren von Ratten) mit einer 0,1% Phenylhydrazin-Lösung (1 Stunde bei $37^{\circ}C$) reduzierte die EPA in Erythrozyten, nicht aber die in eosinophilen Zellen (STRAUS, 1972). Diese Methode zur EPA-Beseitigung wird für die IPT zur Zeit generell empfohlen (STRAUS, 1979). WEIR et al. (1974) beschrieben die Verwendung von 0,074% HCl in Äthanol für die EPA-Blockierung in der Milz von Kaninchen.

Der Virusantigennachweis in den Organen infizierter Tiere ist mit Hilfe der IPT erfolgreich durchgeführt worden (Tab. 11).

4.2.4. Vergleich zwischen der IFT und der IPT

Die Empfindlichkeit beider Methoden für den Nachweis viraler und nichtviraler Antigene ist von mehreren Autoren untersucht worden. Nach BELLON et al. (1975) und BOORSMA et al. (1976) erwies sich die IPT für den Nachweis nichtviraler Antigene als 10 - 30 x empfindlicher als die IFT.

Beim Virusantigennachweis wird der IPT ebenfalls eine höhere Empfindlichkeit als der IFT zugeschrieben (DOUGHERTY et al., 1972; BECKER et al., 1974; STEPHANS et al., 1976; FAISAL, 1977; FAISAL und AHNE, 1980). So konnte das Virusantigen mittels der IPT nicht nur schneller, sondern auch bei einer größeren Anzahl infizierter Zellen nachgewiesen werden [STEPHANS et al., 1976 (Epstein-Barr-Virus); FAISAL, 1977 (Quarantänenvirus); FAISAL und AHNE, 1980 (SVCV, IPNV)]. Die Empfindlichkeit beider Techniken zum Nachweis zellulärer Antigene ist sehr schwierig zu beurteilen, da die Intensität der Fluoreszenz- bzw. IP-Reaktion nicht quantitativ ermittelt werden kann (KAWAMURA, 1974; STERNBERGER, 1979). PRESSMAN et al. (1958) haben festgestellt, daß $1,4 \times 10^4 \mu\text{g/mm}$ der Antigene in Gewebeschnitten (5μ) notwendig sind, um eine spezifische Fluoreszenz zu erhalten. REDA (1964) berichtete, daß mindestens 10^{-6} Gramm NDV-Virusantigen/ infizierte Zelle für eine sichtbare Fluoreszenz notwendig sind. NAKANÉ und KAWAOI (1974) wiesen darauf hin, daß 10 Pikogramm Meerrettichperoxidase histochemisch festgestellt werden kann.

Tabelle 11: Virusnachweis in infizierten Organen mittels der IPT

Virus	Spezies	Organe	IPT-Methode	Vorbehandlung zur EPA-Beseitigung	Autor
Colorado Zeckenfieber-Virus	Maus	Gehirn, Herz, ^x Leber ^x	I	$\text{NaN}_3\text{-H}_2\text{O}_2$	7
Virus der subakuten sklerotisierenden Panencephalitis (SSPE)	Hamster	Gehirn ^x	D	keine	6
Masernvirus	Maus	Gehirn	I	keine	11
Polymavirus	Maus, Mensch	Lunge, Gehirn, Blase	P	$\text{NaN}_3\text{-H}_2\text{O}_2$	14
Sendai- und Mäusepneumonie-Virus	Maus	Lunge	I	keine	12
Hepatitis-B-Virus	Mensch	Leber	I	Perjodssäure-Natriumborhydrid	9
Tollwutvirus	Fuchs, Hund, Schaf, Rind	Gehirn	D	keine	3
Virus der Aviären Leukämie	Hühner	Pankreas	P	entweder abs. Alkohol oder H_2O_2 (0,5%)	4
Myxomatosevirus	Kaninchen	Penis und Knoten am Augenlid und Nase	D	keine	2
Mammatumortumor Virus	Maus	Mamma-Adenokarzinom	D	keine	1
Herpes-simplex-Virus	Mensch	conjunctivale, orale, vulvale, cervicale Abklatschpräparate	I	keine	5

Fortsetzung der Tabelle 11:

Virus	Spezies	Organe	IFT-Methode	Vorbehand- lung zur EPA-Besei- tigung	Autor
Herpes simplex Virus	Mensch, Ratte, Maus	Gehirn	I	Methanol- H_2O_2	15
Virus der New Castle Disease	Hühner	Lunge, Milz ^x	I	Methanol- H_2O_2 (nach der antigen- spezifischen Immunreaktion)	8
Herpesvirus equi	Ham- ster	Leber ^x	I/P	$NaN_3-H_2O_2$	10
Spring Viremia of Carp Virus (SVCV)	Karpfen	Niere, Milz ^x	I	HCl-Athanol	13

x : Kryostatschnitte

P : Peroxidase-Antiperoxidase-Methode (PAP)

I : indirekte

D : direkte

- 1) ANDRE-THOMAS et al. (1974a)
- 2) ANDRE-THOMAS et al. (1974b)
- 3) ATANASIU et al. (1974)
- 4) DOUGHERTY et al. (1974)
- 5) MORISSET et al. (1974)
- 6) DUBOIS-DALCQ et al. (1975)
- 7) DESMOND et al. (1979)
- 8) FINK et al. (1979)
- 9) HUANG und NEURATH (1979)
- 10) TEUFEL et al. (1974)
- 11) VAN POTTELSVERGHE et al. (1979)
- 12) CARTHEWRIGHT und SPARROW (1980)
- 13) FAISAL und AHNE (1980)
- 14) GERBER et al. (1980)
- 15) MARKEL und ZIMMER (1981)

III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

1. Material und Methoden

1.1. Zellkulturen

Die virologischen Untersuchungen wurden mit FHM-(Fathead minnow)-Zellen (GRAVELL und MALSBERGER, 1965) durchgeführt. Die Zellen (Zelleinsaatmenge 5×10^5 Zellen/ml) wuchsen mit Eagle's minimal essential medium (MEM), (EAGLE, 1959) angereichert mit 10% fötalem Kälberserum (FKS), nicht essentiellen Aminosäuren und Antibiotika (Gentamycin, 100 µg/ml, Amphotericin, 50 I.E./ml) bei einer Temperatur von $25 (\pm 1)^\circ\text{C}$ in Plastikflaschen (25, 75 und 175 cm^2), in Mikroplatten sowie in Multiwells (Falcon Nr. 3008) innerhalb von 1 bis 2 Tagen zu Monolayern aus. Dichte Kulturen sind mittels einer Saline-Trypsin (0,05%)-Versen (0,025%-Lösung)(STV) im Verhältnis 1 : 2 bis 1 : 3 subkultiviert worden.

Für die Immunofluoreszenz und die Immunoperoxidase-Reaktion wurden die Zellen auf Deckgläschen in Leighton-Röhrchen gezüchtet.

1.2. Virusmaterial

Als karpfenpathogenes Virus kam der von Prof. Dr. Fijan, Zagreb, zur Verfügung gestellte Spring Viremia of Carp Virusstamm (SVCV), (FIJAN et al., 1971) zur Anwendung. Um die Pathogenität des Erregers zu überprüfen, wurden 4 Fischpassagen (einsömmerige Karpfen, intraperitoneale Virusinjektion bzw. Infektion über das Wasser) durchgeführt. Das bei -80°C aufbewahrte Reisolat wurde für die weiteren Versuche verwendet.

1.3. Virustitration

Die Virustitrationen erfolgten entweder nach der Mikrotitermethode in Mikrotiterplatten oder in Multiwells nach der Plaquemethode. Hierzu sind die in 10er Potenzen verdünnten Virussuspensionen (10^{-1} bis 10^{-8}) in Volumina von 0,1 ml auf die entsprechenden Zellen (3 Reagenten) verimpft worden. Bei der Plaquemethode wurden nach einstündiger Adsorption bei 15°C und anschließendem Absaugen des Impfmateri als, die mit PBS gewaschenen Zellen mit einem auf $39 - 40^{\circ}\text{C}$ erwärmten, agarosehaltigen (1%), trisgepufferten Medium (2 x MEM, 4% FKS) überschichtet. Die infizierten Kulturen kamen bei 20°C zur Inkubation. 72 - 120 Stunden nach der Infektion sind aufgrund des zytopathischen Effektes (CPE) die Kulturinfektionsdosen (KID_{50}) nach der Methode KÄRBER (1931) errechnet worden. Die plaquebildenden Einheiten (PFU) wurden nach der Anzahl der Plaques pro Verdünnungsstufe ermittelt.

1.4. Serumneutralisationstest

Neutralisationsteste wurden nach der Endverdünnungsmethode des Serums durchgeführt. Hierzu sind in 2er Potenzen hergestellte Serumverdünnungsreihen mit einer konstanten Virusmenge von 100 KID_{50} im Verhältnis 1 : 1 gemischt worden. Nach einer Reaktionszeit von 60 Min. bei 15°C wurde das Virusserumgemisch in Volumina von 0,1 ml auf die in Mikroplatten gezüchteten Zellen verimpft. Die Auswertung erfolgte 7 Tage p.i.; als Neutralisationstiter galt die höchste Serumverdünnung die den CPE 100%ig verhinderte.

1.5. Herstellung von SVCV-Antiserum

Zur Antiserumherstellung wurden die in Rouxschalen gezüchteten FHM-Zellen mit SVCV nach der Adsorptionsmethode beimpft. Das infektiöse Kulturmateriel ist nach 96stündiger Inkubation bei 20°C geerntet und zellfrei zentrifugiert worden (300 x g, 20 Min.). Anschließend wurden die Viruspartikel mittels Ultrazentrifugation (Beckmann L 5 - 50 B; Rotor SW 28) bei 60,000 x g eine Stunde sedimentiert und über einen Sucrosegradienten (10 - 50%), (Rotor 50,1, Beckmann), (41,000x g, 60 Min.) gereinigt. Als Impfmateriel dienten die in 0,1 m-Trispuffer resuspendierten, gereinigten Viren.

1.5.1. Kaninchenimmunisierung

Jeweils 3 Kaninchen (Weiße Neuseeländer) wurde das 1 : 1 mit Freund'schem kompletten Adjuvans gemischte Impfmateriel (1 ml/Kaninchen) in beide Hinterextremitäten intramuskulär appliziert. Zwei Wochen nach der Erstimmunisierung bekamen die Tiere gereinigtes Virus ohne Zusatz 2 x intravenös im wöchentlichen Abstand verabreicht. 7 Tage nach der letzten Impfung sind die Kaninchen unter Narcorennarkose entblutet worden. Vor Verwendung kamen die Seren für 30 Min. bei 56°C zur Inaktivierung.

1.5.2. Behandlung des Immunserums mit Gewebepulver (COONS und KAPLAN, 1950; SCHNEIDER, 1964)

30 g von gesunden Karpfen stammendes Leber- und Nierengewebe wurde in 30 ml einer 0,15 M NaCl-Lösung mit einem Homogenisator (Ultra-Turax, IKA, Staufen) zu einer Suspension verarbeitet. Die filtrierte (Mull) Gewebesuspension ist unter ständigem Rühren bei Raumtemperatur mit der 4 fachen Menge Aceton vermischt und anschließend zentrifugiert (2200 x g, 20 Min.) worden. Die Hämoglobinentfernung erfolgte

durch Auswaschen mit Aqua dest. Das letzte Sediment wurde in reichlich Aceton suspendiert, erneut zentrifugiert und wieder mit Aceton behandelt. Dieser Vorgang wurde 3 mal wiederholt. Das wasserfreie Gewebehomogenat ist anschließend 4 Stunden bei 37°C getrocknet worden. 30 g Ausgangsmaterial ergab 2,7 g Gewebepulver. Die Aufbewahrung des Pulvers erfolgte in dicht verschlossenen Flaschen bei -20°C. Für die Serumbehandlung wurden 2 g Gewebepulver mit 40 ml Antiserum verrührt und die Suspension blieb daraufhin für eine Stunde bei Zimmertemperatur unter gelegentlichem Schütteln stehen. Diese Suspension wurde für 30 Min. bei 12000 x g zentrifugiert, der Überstand kam zur Aufbewahrung.

1.5.3. Gewinnung der anti-SVCCV-Immunglobulin (IgG)-reichen Fraktion des Serums (KEKWICK, 1940)

40 ml Antiserum ist gegen 0,1 M PBS (pH 8,0) über Nacht bei Zimmertemperatur dialysiert worden. Danach wurden die Gammaglobuline unter Zugabe von 7,2 g Na₂SO₄ (Merck, Darmstadt), (18%) bei Raumtemperatur gefällt. Das Präzipitat ist in 16 ml einer 0,1 M PBS (pH 8,0) gelöst und zentrifugiert (400 x g, 10 Min.) worden. Anschließend erfolgte eine erneute Behandlung mit 1,92 g Na₂SO₄ (12%) und das resultierende Präzipitat wurde nach Zentrifugation (400 x g, 10 Min.) in 8,0 ml PBS gelöst. Eine weitere Fällung mit 960 mg Na₂SO₄ schloß sich an. Das in 4 ml einer 0,1 M PBS-Lösung aufgenommene Präzipitat ist nach 3 maliger Dialyse (12 Stunden) gegen 0,1 M PBS (pH 8,0) für die Neutralisation-, Immunofluoreszenz- und Immunoperoxidaseteste verwendet worden.

1.6. Nachweis des SVCV-Antigens in Zellkulturen mittels Immunofluoreszenz und Virustitration

1.6.1. Virustitration

Um den zellgebundenen Virusgehalt zu ermitteln, wurden Monolayer von in Leighton-Röhrchen gezüchteten FHM-Zellen mit dem SVCV (1 PFU/Zelle) nach der Adsorptionsmethode beimpft und bei 20°C inkubiert. Jeweils 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36 und 48 Stunden post infectionem (p.i.) sind die infizierten Kulturen nach Absaugen des Mediums 2 mal mit PBS gewaschen worden. Nach Zugabe von 1,5 ml Medium pro Röhrchen wurden die durch 2 maliges Einfrieren und Auftauen aufgeschlossenen Zellen abzentrifugiert, der Überstand kam zur Titration.

1.6.2. Indirekte Immunofluoreszenz (IF)

Für den Antigennachweis in den Zellen kam die indirekte Immunofluoreszenzmethode zur Anwendung. Hierzu sind dichte, in Leighton-Röhrchen gezüchtete Zellen nach der o.g. Methode infiziert worden. In gleichen wie für die Titration angegebenen Zeitintervallen wurden die Deckglaskulturen entnommen, 3 x mit PBS gewaschen, luftgetrocknet und mit Aceton für 10 Min. bei -20°C fixiert. Die anschließend luftgetrockneten Deckgläser kamen luftdicht verschlossen bei -20°C zur Aufbewahrung.

Für den Nachweis des Virusantigens in den infizierten Zellen sind zunächst die virusspezifischen, nicht markierten Antikörper an das Antigen gebunden worden. Hierzu wurden Aceton-fixierte, infizierte und nicht infizierte (Kontrollen) Deckglaszellkulturen mit Anti-SVCV-Immunglobulinen (IgG) beschickt und für eine Stunde in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert. Nach 5 maligen Waschen mit PBS

(je 10 Min.) wurde ein Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-konjugiertes Antikaninchen-IgG (Meloy, Virginia, USA) in einer Verdünnung von 1 : 25 auf die Deckgläschen aufgetragen und bei 37°C in einer feuchten Kammer weiterhin für eine Stunde inkubiert. Die so behandelten Präparate kamen dann nach gründlichem Waschen (3 x 15 Min.) mit PBS unter Verwendung einer 1 : 1 Glycerin-PBS-Mischung (pH 8,0) zur Einbettung.

Ausgewertet wurden die Präparate mit einem Leitz-Dialux-Mikroskop (Auflichtstrahlung, Erregerfilter KP 490).

Als Kontrolle wurden mitgeführt:

- a) Nichtinfizierte, mit SVCV-Antikörpern behandelte Zellen.
- b) Infizierte, mit Kaninchennormalserum behandelte Zellen.

Um die zellgebundenen SVCV-Antigene quantitativ mit der IF-Methode zu erfassen, wurde die Plaquemethode angewandt. Hierzu sind auf Deckgläschen (3×10^5 Zellen/Deckgläschen, 10 x 35 mm) in Petrischalen gezüchtete FHM-Monolayerzellkulturen mit Organsuspensionen von SVCV-infizierten Karpfen in Verdünnungen von 10^{-1} bis 10^{-8} infiziert worden. Nach einstündiger Adsorption bei 15°C wurde das Impfmateriel abgessaugt. Anschließend kamen die infizierten Kulturen nach Überschichtung mit einem auf ca. 38°C erwärmten Agarose (0,3%)-Mediumgemisch bei 20°C zur Inkubation. 12, 24, 48, 72 und 96 Stunden p.i. sind die infizierten Zellen nach Entfernen der Agarose und 3 maligen Waschen (PBS) nach der oben beschriebenen Methode für die IF weiterbehandelt worden. Bei der Auswertung galt jede fluoreszierende Zelle bzw. Zellgruppe als 1 Plaque (Bezirk). Der Antigentiter errechnete sich aus der durchschnittlichen Anzahl der positiven Bezirke/Deckgläschen x Verdünnung.

Zur Kontrolle wurden Paralleltitrationen nach der Plaquemethode in Multiwells bzw. nach der Mikromethode durchgeführt.

1.7. SVCV-Antigennachweis in Zellkulturen mit Hilfe der Immunoperoxidasetechnik

Die Arbeitsschritte des Antigennachweises mit Hilfe der indirekten Immunoperoxidasereaktion gleichen im Prinzip denen der IF-Technik. Anstelle des FITC-konjugierten ~~-8-~~ Globulin wurde ein mit Meerrettichperoxidase-markiertes Antikaninchen-IgG (Pasteur Institut, Paris; Sigma, München) verwendet. Als Substrat dienten 3-3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid (DAB), (Fluka, Neu Ulm) 0,05%ig in 0,05 M Trispuffersaline (TBS), (pH 7,6) unter H_2O_2 -Zusatz (0,01%), (GRAHAM und KARNOVSKY, 1966).

Die nach der Acetonfixierung mit SVCV-Antikörpern und mit Peroxidase-markierten Antikaninchen-IgG beschichteten Zellkulturen wurden bei Raumtemperatur mit dem Substrat unter H_2O_2 -Zusatz für 10 Min. überlagert. Die Reaktion ist durch Waschen mit Aqua dest. (5 Min.) gestoppt worden. Nach aufsteigender Alkoholreihe kamen die mit Eukitt eingebetteten Präparate zur lichtmikroskopischen Untersuchung.

Zur quantitativen Ermittlung des Antigengehaltes mit der Immunoperoxidasetechnik wurden die infizierten Zellen wie unter 1.6.2. beschrieben mit Agarose behandelt, mit Aceton fixiert und wie oben angeführt der Peroxidasereaktion unterzogen.

1.8. SVCV-Antigennachweis in Karpfengeweben

1.8.1. Versuchsfische

40 Karpfen (Cyprinus carpio), (K_{1-2}) aus isolierter Aquarienaufzucht wurden freundlicherweise vom Tiergesundheitsdienst Bayern e.V., Grub, für die Versuche zur Verfügung gestellt. Die Tiere sind in 200 Liter Durchflußaquarien bei einer Wassertemperatur von $12 (^{+1})^{\circ}C$ gehältert und mit Trockenfutter ernährt worden. Der pH-Wert des Wassers lag

bei 7,5 und die Sauerstoff-Konzentration betrug 3,1 mg O₂/Liter. Vor Versuchsbeginn wurden 3 Fische auf Virus- und Antikörperpräsenz untersucht. Diese Untersuchungen ergaben keine Hinweise auf eine Virusinfektion. Antikörper gegenüber SVCV waren im Serum der Fische nicht nachweisbar.

1.8.2. Infektion von Karpfen über das Wasser

Als Infektionsmaterial diente SVCV in der ersten Zellkulturpassage. 30 Karpfen wurden in SVCV-haltigem Wasser (40 Liter), (5×10^4 PFU/1 ml Wasser) für zwei Stunden unter Luftzufuhr gehalten. Die Kontrollen (10 Fisch) sind in ähnlicher Weise mit einem Zusatz einer gleichen Menge nicht-infektiöser Kulturflüssigkeit behandelt worden. Nach der Infektion wurden die Tiere in 200 l Aquarien umgesetzt.

In 84-stündigem Rhythmus sind Leber, Niere und Milz von jeweils 3 Fischen entnommen worden.

1.8.3. Virusisolierung

Die entnommenen Fischorgane wurden auf Virusgehalt untersucht. Hierzu ist das Anzuchtmaterial gewogen, homogenisiert, mit MEM (2% FKS) 1 : 10 G/V verdünnt und bei $1000 \times g$ (4°C) für 15 Min. zentrifugiert worden. Der filtrierte (300 nm) Überstand wurde in 10er Potenzen verdünnt (10^{-1} - 10^{-8}) und auf in Mikrotiter- und Plaqueplatten gezüchtete FHM-Zellen verimpft.

1.8.4. Herstellung von Gewebeschnitten

0,5 - 1 cm³ große Proben von Leber, Milz und Niere der Fische wurden in einer Schnellgefrierkammer (CO₂) in ca. 10 Sekunden eingefroren. Die gefrorenen Proben kamen unter Luftabschluß bei -20°C zur Aufbewahrung. 4 - 6 μ messende Dünnschnitte wurden mit einem Kryostat-Mikrotom (AO-CRYO-CUT, 840 C) bei -20°C angefertigt, luftgetrocknet und

mit Aceton für 20 Min. bei 20°C fixiert. Die so vorbehandelten Schnitte sind in luftdicht verschlossenen Behältern bei -20°C gelagert worden.

1.8.5. SVCV-Antigennachweis in Gefrierschnitten mit der indirekten IF-Methode

Die von infizierten und nichtinfizierten Karpfen angefertigten Gefrierschnitte (Leber, Milz, Niere) wurden nach Acetonfixierung, wie unter 1.6.2. beschrieben, für die Immunofluoreszenz aufgearbeitet.

1.8.6. Nachweis der endogenen Peroxidase in Fischgeweben

Gefrierschnitte von Leber, Milz und Niere nichtinfizierter Karpfen wurden mit Peroxidase-Substrat (DAB) nach der unter 1.7. beschriebenen Methode behandelt.

1.8.7. Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivitäten in Karpfengeweben

a) Wasserstoffsuperoxid H_2O_2

Die Schnitte wurden mit 0,01; 0,1 und 1%iger H_2O_2 -Lösung in TBS für 10, 20 und 30 Min. bei Zimmertemperatur behandelt.

b) Natriumazidlösung, (NaN_3) , (TEUFEL et al., 1974)

Die Schnitte kamen mit 0,001 bzw. 0,01 M NaN_3 -Lösung in TBS, die 0,01% H_2O_2 enthielt, für 10 Min. bei Raumtemperatur zur Vorbehandlung.

c) Äthanol-HCl (WEIR et al., 1974)

Die Schnitte sind mit 0,074% HCl in Äthanol für 15 Min. bei Zimmertemperatur behandelt worden. Anschließend wurden die Präparate mit 0,01 M PBS für 3 Stunden weiter inkubiert.

d) Methanol H_2O_2 (STREEFKERK, 1972)

Nach Verbringen der Präparate in Methanol (abs.) für 15 Min. wurden diese mit 0,006%iger bzw. 0,01%iger H_2O_2 -Lösung in TBS für 30 Min. inkubiert.

e) Phenylhydrazin (STRAUS, 1972)

Mit 0,05% bzw. 0,1% einer frisch hergestellten Phenylhydrazinlösung (PBS, pH 7,0) wurden die Schnitte für eine Stunde bei 37°C behandelt.

f) Methanol-Natriumferricyanid-Essigsäure (STRAUS, 1971)

Die Schnitte wurden mit einer Lösung bestehend aus Methanol (abs.), 1% Natriumferricyanid und 1% Essigsäure (99%) für 15 Min. bei Zimmertemperatur inkubiert.

Nach der Behandlung mit den verschiedenen o.g. Chemikalien sind sowohl infizierte wie auch nichtinfizierte Gewebeschnitte nach 4 maligem Waschen mit TBS auf Peroxidaseaktivitäten untersucht worden.

1.8.8. SVCV-Antigennachweis in Gewebeschnitten mit der indirekten IP-Methode

Die von infizierten und nichtinfizierten Organen (Leber, Milz und Niere) angefertigten Gefrierschnitte wurden mit H_2O_2 (0,1%) für 20 Min. inkubiert. Die so vorbehandelten Schnitte kamen für die Immunoperoxidasereaktion nach der unter 1.7. beschriebenen Methode zur weiteren Aufarbeitung.

2. Ergebnisse

2.1. Immunserumherstellung

Nach Ultrazentrifugation des virushaltigen Zellkulturmediums und anschließender Reinigung des pelletierten Virus über einen Sucrosegradienten ist der Virusgehalt um ca. $2 \log_{10}$ KID₅₀/ml konzentriert worden.

Obwohl die verabreichte Virusmenge sowie das Immunisierungsprogramm für die drei Kaninchen gleich waren, wurde nur bei einem Tier neutralisierende SVCV-Antikörper (1 : 16) festgestellt.

Nach Adsorption des Immunserums an Karpfengewebepulver konnten die unspezifischen Reaktionen, die vorher bei der IFT bzw. IPT aufgetreten waren, völlig beseitigt werden.

Bei der Verwendung der Anti-SVCV-immunoglobulinreichen Fraktion des Serums erhöhte sich der Neutralisationstiter auf 1 : 128 und es wurde die Brillanz der Fluoreszenz bzw. Stärke der Peroxidasereaktion erheblich gesteigert. Die Titrationen der Immunoglobuline und der Konjugate ergaben für die Reagenten eine optimale Arbeitsverdünnung von 1 : 25.

2.2. Nachweis von SVCV-Antigen in Zellkulturen mittels IFT und IPT

In diesem Versuch sollte geklärt werden, ab welchem Zeitpunkt p.i. das SVCV-Antigen mit der IFT bzw. IPT in Zellkulturen nachgewiesen werden kann. Zur Kontrolle wurde der Virusgehalt der Zellen mittels Plaquetitration in den Zeitabständen 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36 und 48 p.i. quantitativ erfaßt (Tab. 12).

2.2.1. Ergebnisse der IFT:

Das Virusantigen wurde in FHM-Zellen 6 Std. p.i. ermittelt. Der zellgebundene Virustiter betrug zu diesem Zeitpunkt $2,2 \times 10^4$ PFU/ml. Wenige Zellen (<5%) zeigten in Kernnähe Zytoplasmafluoreszenz. Die Anzahl der fluoreszierenden Zellen nahm 12 Stunden p.i. um ca. 35% zu. So zeigten ungefähr 40% der Zellen eine helle diffuse Fluoreszenz (Abb. 1a). Das Zytoplasma einiger Zellen zeigte eine granuläre, fein staubförmig verteilte Fluoreszenz (Abb. 1b). Der Virustiter in den Zellen betrug zu diesem Zeitpunkt $1,2 \times 10^5$ PFU/ml. 24 Std. p.i. konnte in 75% der infizierten Zellen das Antigen ermittelt werden. 36 Std. p.i. (zellgebundener Virustiter $1,8 \times 10^6$ PFU/ml) war das Zytoplasma einiger Zellen mit großen fluoreszierenden Granula erfüllt. Dagegen wurde niemals in den Kernen und an den Zellwänden Fluoreszenz beobachtet. Das Antigen wurde öfters auch in mit anderen Zellen in Verbindung stehenden Zytoplasmafortsätzen nachgewiesen. 36 Stunden nach der Infektion trat erstmals ein CPE auf, der 48 Std. p.i. 90% betrug. Die Kontrollen zeigten keine Fluoreszenz.

2.2.2. Ergebnisse der IPT:

Bereits 2 Std. p.i. konnte das SVCV-Antigen in einigen Zellen nachgewiesen werden. Zu diesem Zeitpunkt betrug der Virustiter $2,9 \times 10^4$ PFU/ml. Die antigenspezifische Braunfärbung der infizierten Zellen nahm hinsichtlich der Verteilung und Intensität 4 Std. p.i. zu. 6 Std. p.i. traten körnige, dunkelbraune Granula im Zytoplasma auf (Abb. 2a). Zwei Stunden später verteilte sich das Virusantigen in ca. 20% der Zellen gleichmäßig über das gesamte Zytoplasma (Abb. 2b). 10 und 12 Std. p.i. fand man das Virusantigen in ca. 50% der Zellen, wobei in einigen Fällen das Zytoplasma tiefbraun angefärbt war und keine

Struktur mehr erkennen ließ. Der helle Zellkern hob sich deutlich vom stark antigenhaltigen Zytoplasma ab. In zytoplasmatischen Fortsätzen erkannte man eindeutig das Virusantigen. 24 und 36 Stunden p.i. nahm die Anzahl der intensiv braun gefärbten Zellen zu. 36 Std. p.i. trat auch hier erstmals ein CPE auf. Ab 48 Std. p.i. sah man geschrumpfte, antigenhaltige (stark braun gefärbte) Zellgruppen.

Tabelle 12: Nachweis von SVCV-Antigen in infizierten FHM-Zellen mit der IFT und IPT sowie die Ermittlung infektiöser Viruspartikel in Abhängigkeit zur Zeit nach der Infektion

Zeit p.i. (Stunden)	Virustiter (PFU/ml)	CPE- Auftritt	durchschnittlicher Prozentsatz an positiven $\times$ Zellen/Deckglas	
			IFT	IPT
0	$1,8 \times 10^4$	-	-	-
2	$2,9 \times 10^4$	-	-	2%
4	$1,7 \times 10^4$	-	-	5%
6	$2,2 \times 10^4$	-	5%	10%
8	7×10^3	-	10%	20%
10	9×10^4	-	15%	25%
12	$1,2 \times 10^5$	-	40%	50%
24	$2,4 \times 10^6$	-	75%	75%
36	$1,8 \times 10^6$	++	90%	90%
48	$1,1 \times 10^6$	++++	90%	90%

x Visuell geschätzte Werte

- kein CPE

++ 50% CPE

++++ mehr als 25% CPE

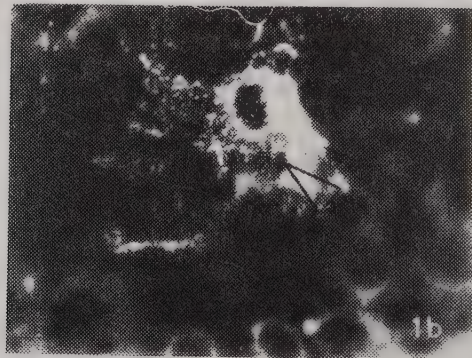
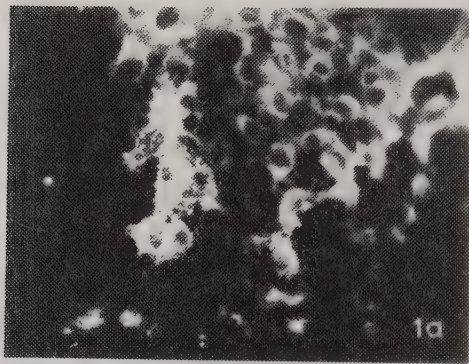


Abbildung 1a: Diffuse Zytoplasmafluoreszenz SVCV-infizierter FHM-Zellen (12 Std. p.i.), (x 400)

Abbildung 1b: Staubförmige bis granuläre Zytoplasmafluoreszenz SVCV-infizierter FHM-Zellen (12 Std. p.i.), (x 800)

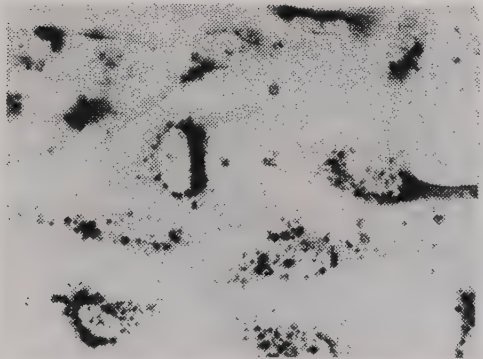
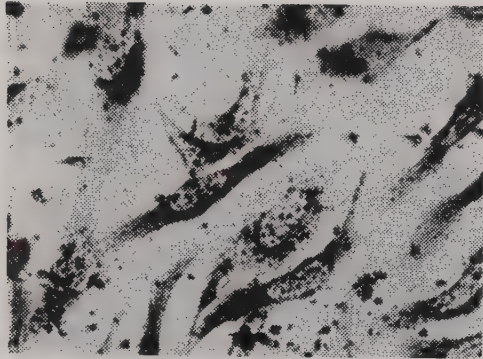


Abbildung 2a: Immunoperoxidasereaktion im Zytoplasma SVCV-infizierter FHM-Zellen (6 Std. p.i.), (x 800)

Abbildung 2b: Immunoperoxidasereaktion im Zytoplasma SVCV-infizierter FHM-Zellen (8 Std. p.i.), (x 800)

2.3. Titration infizierter Karpfengewebe mit der IFT, der IPT, der Plaquemethode und im Mikrotitersystem

Die obengenannten Methoden wurden hinsichtlich der Schnelligkeit und Empfindlichkeit des quantitativen SVCV-Nachweises untersucht.

Für die Titerbestimmung mit der IFT bzw. IPT wurden die Virusverdünnungsstufen mit mindestens 30 Plaques ausgewertet.

Bei der fluoreszenz- und lichtmikroskopischen Auswertung konnten die stark fluoreszierenden bzw. peroxidase-positiven Zellen 12 bzw. 24 Stunden p.i. klar von den nichtinfizierten Zellen unterschieden werden.

Infolge der Virusvermehrung nahm die Intensität der Fluoreszenz bzw. IP-Reaktion 24 Stunden p.i. zu und breitete sich von den Zentren zu den peripher gelegenen Zellen aus (Abb. 3a).

In einigen Fällen konnten 48 Stunden p.i. lysierte Plaquezentren mit positiver IF- bzw. IP-Reaktion der umgebenen Zellen beobachtet werden (Abb. 3b).

Die Abbildung 4 zeigt die in Abhängigkeit zur Zeit, 12, 24, 48, 72 und 96 Stunden p.i. mit den verschiedenen Methoden ermittelten Virustiter. Bei der IFT bzw. IPT lagen die durchschnittlichen Titer der fluoreszierenden Bezirke (FB) sowie die der Peroxidase-positiven Bezirke (PB), (3 Deckgläschen/Verdünnung) 12 Stunden p.i. bei $1,1 \times 10^2$ FB bzw. $3,2 \times 10^2$ PB/0,1 ml Organsuspension. 24 Stunden p.i. wurden Virustiter von $3,9 \times 10^5$ FB bzw. $1,7 \times 10^6$ PB erreicht, die 48 Stunden p.i. mit $9,6 \times 10^7$ FB bzw. $8,2 \times 10^7$ PB/0,1 ml Organsuspension am höchsten waren. 72 Stunden p.i. sank der Virusgehalt von $5,2 \times 10^7$ FB bzw. 7×10^7 PB auf 3×10^6 FB bzw. $5,6 \times 10^6$ PB/0,1 ml Organsuspension nach 96 Stunden p.i. ab.

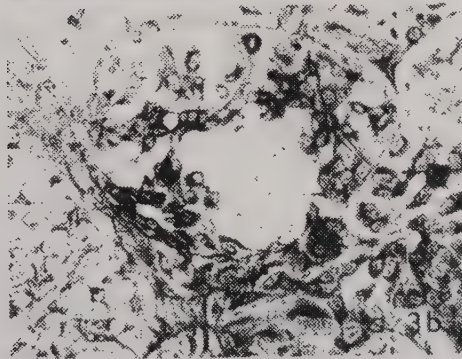
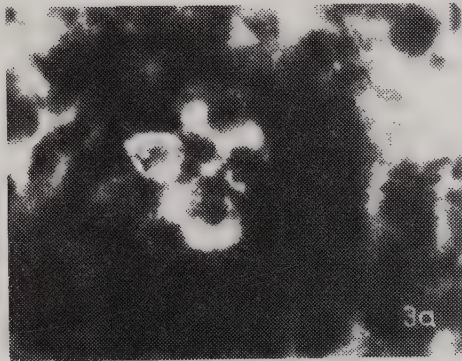


Abbildung 3a: Zytoplasmafluoreszenz SVCV-infizierter FHM-Zellen (Plaquemethode, 24 Std. p.i.), (800 x)

Abbildung 3b: Plaqueausbildung mit Peroxidase-positiven Zellen SVCV-infizierter FHM-Zellen (48 Std. p.i.), (300 x)

Mit der Plaquemethode wurden 24 Stunden p.i. zwar Zellveränderungen (intensivere Blaufärbung mit Kristalviolett als bei den nichtinfizierten Zellen) aber keine Lysis (Plaques) beobachtet. Ab 48 Stunden p.i. traten Plaques auf.

Der Plaquetiter (PFU) stieg 48 Stunden p.i. von $3,5 \times 10^5$ auf $1,2 \times 10^6$ PFU/0,1 ml Organsuspension (96 Stunden p.i.).

Mit der Mikrotitermethode stieg der Virustiter von $10^{2,2}$ Organsuspension auf $10^{6,2}$ KID₅₀/0,1 ml 96 Stunden p.i.

Tabelle 13: SVCV-Nachweis in infizierten Zellkulturen mit der Mikrotitermethode, Plaquemethode sowie mit der IFT und IPT in Abhängigkeit zur Zeit p.i.

Zeit p.i.	Mikrotiter- methode	Plaue- methode	IFT	IPT
12 Stunden	-	-	+	+
24 Stunden	+	-	+	+
48 Stunden	+	+	+	+

- negativ

+ positiv

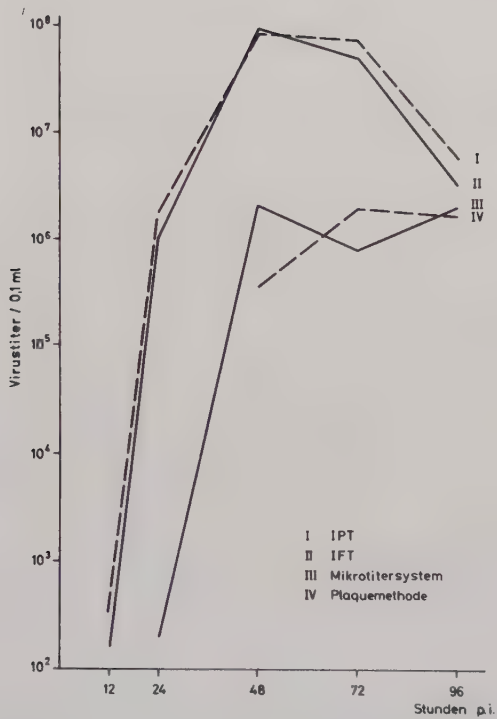


Abbildung 4: Quantitative Ermittlung des SVCV-Gehaltes in Organsuspensionen von infizierten Karpfen mit der IFT IPT, Plaquemethode und im Mikrotitersystem

2.4. Nachweis endogener Peroxidaseaktivitäten (EPA) in der Leber, in der Milz und in der Niere von Karpfen

Leber, Milz und Niere der Karpfen zeigten nach H_2O_2 -DAB-Behandlung deutliche EPA. In der Leber waren diese nur auf die Blutgefäße beschränkt.

2.5. Blockierung der EPA im Fischgewebe

Um die EPA zu blockieren, wurden eine Reihe von chemischen Substanzen (Tab. 14) untersucht. In der Leber und der Niere konnten die EPA mit allen verwendeten Chemikalien völlig beseitigt werden. Dagegen wurden aber die EPA in der Milz nur mit Methanol H_2O_2 , Methanol-Nitroferricyanid-Essigsäure oder mit HCl-Äthanol bis zu 100% blockiert.

Phenylhydrazin bzw. Natriumazid (NaN_3)- H_2O_2 inaktivierten die EPA der Milz dagegen nur teilweise, eine 20-minütige Behandlung mit 0,1% H_2O_2 hatte dagegen eine überwiegende EPA-Reduzierung zur Folge. Um die Wirkung der o.g. Chemikalien auf die Stabilität des SVCV-Antigens zu ermitteln, wurden die vorbehandelten, infizierten Gefrierschnitte von Milz, Leber, Niere 7 Tage und 14 Tage p.i. mit der IPT bzw. IFT untersucht.

Hinsichtlich der EPA-Blockierung ohne Schädigung des Antigens erwies sich die H_2O_2 -Behandlung als Methode der Wahl (Tab. 14). In der Leber und Niere waren nach einer 20-minütigen Behandlungszeit mit 0,1% H_2O_2 keine EPA mehr nachweisbar. Obwohl nach derselben Behandlungszeit in der Milz noch EPA Restaktivitäten vorhanden waren, konnten die spezifischen IP-Reaktionen durch ihre lokalisierten, tiefbraunen Granula gut erkannt werden. Wurde die H_2O_2 -Behandlung nach der ersten antigenspezifischen Immunreaktion durchgeführt, so trat die spezifische Reaktion des IP-Komplexes deutlicher hervor.

Bei der $\text{NaN}_3\text{-H}_2\text{O}_2$ -Methode konnten mit einer Konzentration von 0,01 M NaN_3 die EPA der Leber und Niere völlig, die der Milz überwiegend reduziert werden. Diese Behandlung hatte auf das Antigen einen schädigenden Einfluß, da die Fluoreszenz bzw. die IP-Reaktion schwächer wurde. Mit den Methanol- H_2O_2 - und Methanol-Essigsäure-Nitroferricyanid-Behandlungen wurde zwar eine völlige EPA-Inaktivierung erreicht, das SVCV-Antigen war aber danach nicht mehr nachweisbar.

Durch die Behandlung der Gewebe mit HCl-Äthanol bzw. Phenylhydrazin konnte ebenfalls die EPA blockiert werden, spezifische Immunreaktionen waren dagegen undeutlich ausgeprägt. Es gelang nicht bei den so vorbehandelten Proben, die mit der H_2O_2 -Behandlungsmethode deutlich positive waren, das Antigen 7 Tage p.i. nachzuweisen. Erst bei Gewebeproben, die 14 Tage p.i. nach Vorbehandlung mit HCl-Äthanol bzw. Phenylhydrazin untersucht worden waren, sah man einige positive Bezirke.

Tabelle 14: Blockierung der EPA im Fischgewebe

Methode			Leber	Milz	Niere	Schädigung des Antigens
H ₂ O ₂	0,01%	10 Min	+	+	+	nein
		20 "	+	+	+	"
		30 "	+	+	+	"
	0,1%	10 "	+++	+	++	"
		20 "	+++	++	+++	"
		30 "	+++	++	+++	"
	1%	10 "	+++	++	+++	"
		20 "	+++	++	+++	"
		30 "	+++	++	+++	"
Natriumazid (NaN ₃) + 0,01% H ₂ O ₂						
	0,001 M	+++	+	++	nein	
	0,01 M	+++	++	+++	teilweise	
Methanol + H ₂ O ₂						
	0,006%	+++	+++	+++	ja	
	0,01%	+++	+++	+++	ja	
Behandlung nach er- folgter Immunreaktion			+++	+++	+++	teilweise
HCl-Äthanol			+++	++	+++	teilweise
Methanol-Na.Nitroferri- cyanid-Essigsäure			+++	+++	+++	ja
Phenylhydrazin						
	0,05%	+++	+	+++	teilweise	
	0,1%	+++	++	+++	teilweise	

+ : teilweise EPA-Entfernung

++ : überwiegende "

+++ : völlige "

2.6. Nachweis des SVCV-Antigens in Gefrierschnitten infizierter Karpfenorgane mit der IFT und IPT

Sowohl mit der IFT, IPT als auch mit der Mikrotitermethode konnte 2 Stunden und 3 1/2 Tage p.i. das Virus in der Leber, Niere und Milz infizierter Karpfen nicht nachgewiesen werden.

7 Tage p.i. war das Virusantigen erstmals in diesen Organen mittels der IFT bzw. IPT nachweisbar (Tab. 15).

In Gefrierschnitten der Nieren sind mit der IFT fluoreszierende Herde in den interstitiellen Zellen beobachtet worden (Abb. 5a, 5b). Mit 800facher Vergrößerung wurden stark fluoreszierende Granula im Zytoplasma infizierter Zellen festgestellt.

Auch mittels der IPT war das Virusantigen im Nierengewebe deutlich nachweisbar (Abb. 6a).

Obwohl man das Virusantigen 7 Tage p.i. in der Niere aller 3 untersuchten Fische nachweisen konnte, wurde das Antigen in der Milz und Leber nur eines Fisches zu diesem Zeitpunkt festgestellt. In der Milz war die Nachweisreaktion (IF bzw. IP) auf die weiße Pulpa beschränkt (Abb. 5c, Abb. 6b). Im Leberparenchym sah man herdförmige IFT- (Abb. 5d) und IPT-positive Bezirke. Von allen Nierenproben ließ sich das Virus 7 Tage p.i. mit Titern von 3,2; 2,8 und 5,5 $\log_{10}$ KID₅₀/g reisolieren. Dagegen blieben aber die Virusisolierungsversuche bei Milz- und Leberproben negativ.

10 1/2 Tage p.i. konnte man das Virus in der Leber, Milz und Niere der 3 Fische mit allen verwendeten Methoden eindeutig nachweisen. Hinsichtlich der herdförmigen Verteilung des Virusantigens in den infizierten Organen wurden sowohl mit der IFT als auch mit der IPT ähnliche Befunde 10 1/2 Tage p.i. ermittelt.

In der Niere trat das Virusantigen um die Tubuli lokalisiert auf, dagegen war die Antigenansammlung in der Leber gleichmäßig im Parenchym verteilt (Abb. 6c). Die Anzahl der IF- und IP-positiven Bezirke war in der Leber größer als in der Milz. 2 Wochen p.i. nahmen die IF- und IP-positiven Bezirke in allen Proben deutlich zu. Auch in den Blutgefäßen wurden einige IF- bzw. IP-positiven Zellen beobachtet.

17 1/2 Tage p.i. nahm die Stärke der IF- bzw. IP-Reaktion bei den Nierenproben ab.

In der Leber und Milz trat das Antigen zu diesem Zeitpunkt dagegen massiert auf.

Im Gegensatz zu diesen Organen sank 21 bzw. 24 1/2 Tage p.i. der Virusgehalt in der Niere der infizierten Karpfen ab. So konnten in diesem Organ der Fische Nr. 21, 23 und 24 weder eine positive IF- bzw. IP-Reaktion noch infektiöse Virustiter nachgewiesen werden.

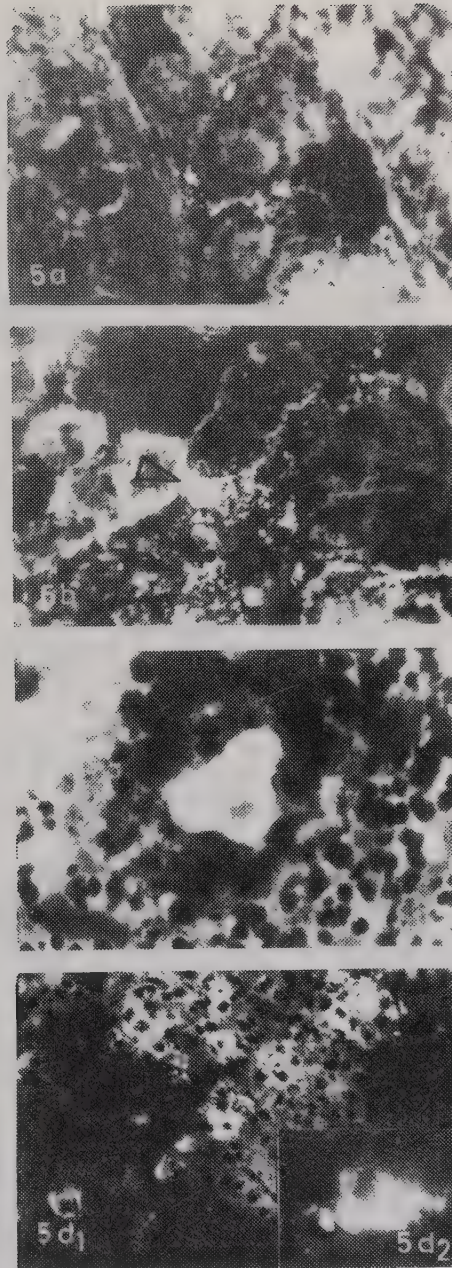


Abbildung 5: Legende siehe Seite 52

Abbildung 5a: Beginnende Fluoreszenz in der Niere SVCV-infizierter Karpfen (Gefrierschnitt, 7 Tage p.i.), (300 x)

Abbildung 5b: Ausbreitung der Fluoreszenz in der Niere SVCV-infizierter Karpfen (Gefrierschnitt, 3 Wochen p.i.), (300 x)

Abbildung 5c: Auf die weiße Pulpa der Milz beschränkte Fluoreszenz SVCV-infizierter Karpfen (Gefrierschnitt, 2 Wochen p.i.), (800 x)

Abbildung 5d₁: Fluoreszenz in der Leber SVCV-infizierter Karpfen (Gefrierschnitt, 2 Wochen p.i.), (300 x)

Abbildung 5d₂: Wie Abb. 5d₁ (800 x)

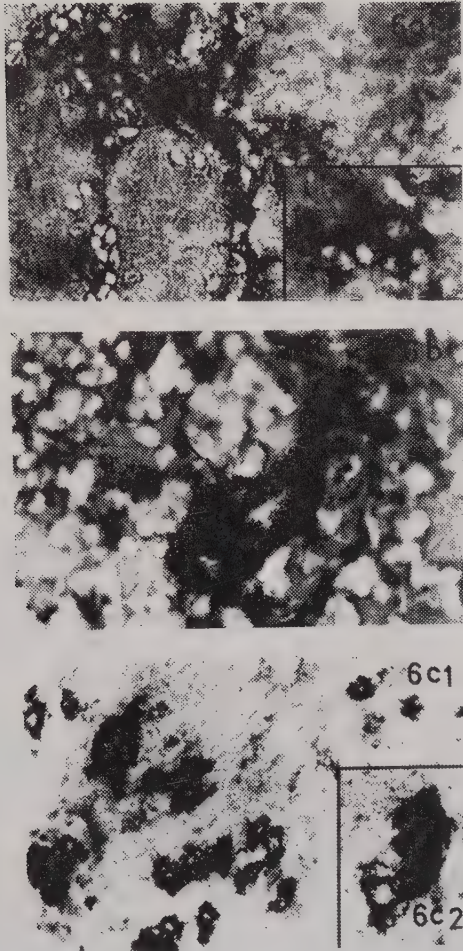


Abbildung 6: Legende siehe Seite 54

Abbildung 6a₁: Immunoperoxidase-Reaktion in der Niere
SVCV-infizierter Karpfen (Gefrierschnitt,
2 Wochen p.i.), (300 x)

Abbildung 6a₂: Wie Abb. 6a₁ (800 x)

Abbildung 6b: Auf die weiße Pulpa der Milz beschränkte
Immunoperoxidasreaktion SVCV-infizierter
Karpfen (Gefrierschnitt, 2 Wochen p.i.),
(800 x)

Abbildung 6c₁: Gleichmäßig im Parenchym der Leber ver-
teilte Immunoperoxidasereaktionszentren
SVCV-infizierter Karpfen (Gefrierschnitt,
2 Wochen p.i.), (300 x)

Abbildung 6c₂: Wie Abb. 6c₁ (800 x)

Tabelle 15: Nachweis des SVCV mittels der IFT, der IPT und der Virusisolierung in Geweben verschiedener Karpfen nach einer Infektion über das Wasser

Tage p.i.	Fisch Nr.	Organe	Virustiter $\log_{10} \text{ KID}_{50}/\text{g}$	IFT	IPT
7	7	L	-	-	-
		M	-	-	-
		N	3,2	++	++
	8	L	-	-	-
		M	-	-	-
		N	2,8	+	+
	9	L	-	+	+
		M	-	+	+
		N	5,5	++++	++++
10 1/2	10	L	5,2	+++	+++
		M	3,5	+	+
		N	5,5	++++	++++
	11	L	5,2	++	++
		M	3,8	++	++
		N	5,8	++++	++++
	12	L	5,5	+++	+++
		M	3,2	++	++
		N	5,5	++++	++++
14	13	L	5,5	+++	+++
		M	5,5	+++	+++
		N	7,5	++++	++++
	14	L	4,5	+++	+++
		M	4,5	+++	+++
		N	7,2	++++	++++
	15	L	4,8	+++	+++
		M	4,8	+++	+++
		N	6,8	++++	++++

Fortsetzung der Tabelle 15:

Tage p.i.	Fisch Nr.	Organe	Virustiter $\log_{10}$ KID ₅₀ /g	IFT	IPT
17 1/2	16	L	7,2	++++	++++
		M	7,8	++++	++++
		N	7,2	++++	++++
	17	L	5,5	+++	+++
		M	4,8	+++	+++
		N	3,8	+	+
	18	L	5,5	++++	++++
		M	4,5	++++	++++
		N	3,5	++	++
21	19	L	6,2	+++	+++
		M	2,8	++	++
		N	1,8	+	+
	20	L	7,5	++++	++++
		M	3,5	+	+
		N	-	+	+
	21	L	3,5	++++	++++
		M	2,8	++	++
		N	-	-	-
14 1/2	22	L	7,2	++++	++++
		M	5,8	++++	++++
		N	4,8	++	++
	23	L	3,8	+++	+++
		M	3,8	++	++
		N	-	-	-
	24	L	5,5	++++	++++
		M	3,5	++++	++++
		N	-	-	-

- negativ
+ einzelne kleine positive Bezirke
++ mehrere positive Bezirke
+++ fusionierte positive Bezirke
++++ Antigenaggregate, großflächige positive Reaktionen

L: Leber

M: Milz

N: Niere

IV. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

1. Immunserumherstellung

Von den 3 gegenüber SVCV immunisierten Kaninchen bildete nur eines einen meßbaren Antikörpertiter (1 : 16) aus. Die Ursachen hierzu sind ungeklärt. Es ist jedoch aus der Literatur bekannt, daß die Antiserumherstellung gegenüber Fischrhadoviren sowohl in homologen wie auch in heterologen Systemen sehr unterschiedliche, nicht immer reproduzierbare Ergebnisse liefert (AHNE, 1981; HILL et al., 1981).

Nach einer persönlichen Mitteilung von HILL (1980) kann es vorkommen, daß 1 Kaninchen einer Immunisierungsreihe (20) gegenüber SVCV überdurchschnittliche hohe Neutralisationstiter aufweist, die restlichen Tiere aber keine Antikörper ausbilden. Da die Nachfrage nach Antiseren gegenüber Fischviren steigt, ist man in verschiedenen Laboratorien bemüht, diese Probleme experimentell zu untersuchen.

Nach Adsorption des SVCV-Antiserums an Karpfengewebepulver mit anschließender Fällung der IgG-reichen Serumfraktion mit Na_2SO_4 (KEKWICK, 1940) stieg der NT-Titer von 1:16 auf 1 : 128 und der Antigennachweis mit der IFT bzw. IPT lieferte ein eindeutigeres Bild.

Die unspezifischen Reaktionen konnten durch diese Behandlungsmethoden des Serums völlig beseitigt werden, was mutmaßlich auf den Konzentrierungseffekt der virusspezifischen Antikörper zurückzuführen ist.

JØRGENSEN und MEYLING (1972) berichteten ebenfalls über die Beseitigung unspezifischer, die Spezifität der Fluoreszenzdiagnose beeinträchtigender Reaktionen durch Adsorption von VHSV-Kaninchenantiserum an Forellengewebepulver und anschließender Globulinfällung mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Da die Globulinfällung befriedigende Ergebnisse hinsichtlich der IFT, IPT und des NT brachte, wurde auf weitere Reinigungsverfahren der IgG-reichen Serumfraktion z.B. durch Säulenchromatographie verzichtet

SWANSON und GILLESPIE (1981) beseitigten die unspezifische Reaktion (Fluoreszenz) eines IPN-Antiserums durch 9 malige Adsorption an Forellengewebepulver, ein Verfahren, das sehr zeitaufwendig ist.

Die in der vorliegenden Arbeit benutzten Reinigungsmethoden (Adsorption an Gewebepulver und Globulinfällung) des Antiserums erbrachten bei einem geringeren Zeitaufwand ähnliche Ergebnisse. Aus diesem Grund scheint eine einmalige Adsorption des Antiserums an Fischgewebepulver mit nachfolgender Fällung der Globuline eine geeignete Methode zur Beseitigung unspezifischer Serumkomponenten darzustellen.

2. Nachweis von SVCV-Antigen in Zellkulturen mittels IFT bzw. IPT

Die vorliegenden Ergebnisse lassen erkennen, daß die Replikation des SVCV in FHM Zellen mit der IFT bzw. IPT verfolgt werden kann. Bei der IPT zeigte das Zytoplasma antigenhaltiger Zellen je nach dem Infektionsstadium neben den stark gefärbten Granula und den kornförmigen Strukturen unterschiedliche Brauntöne. Bei der Immunfluoreszenz traten mäßig im Zytoplasma verteilte fluoreszierende Granula auf. Beide Methoden sind hinsichtlich des zeitabhängigen Antigennachweises als ungleichwertig zu betrachten.

Mit der IPT war das SVCV-Antigen bereits 2 Stunden bzw. 4 Stunden p.i. in einigen Zellen nachweisbar. Zu diesem Zeitpunkt gelang es nicht, das Antigen mit der IFT zu ermitteln. Die Anzahl der infizierten Zellen sowie die Intensität der Reaktionen war im allgemeinen bis zu 12 Stunden p.i. mit der IPT größer als mit der IFT.

Da der CPE erst 36 Stunden p.i. auftrat erscheint die IPT bzw. IFT zum Nachweis von SVCV-Infektionen gegenüber der Virusisolierung überlegen. Anhand der vorliegenden

Ergebnisse ist die IPT schneller und empfindlicher als IFT für den Nachweis von SVCV-Antigen in FHM-Zellkulturen. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen DOUGHERTY et al. (1972), (ALV); BECKER et al. (1974), (TGE-Virus); STEPHANS et al. (1976), (Epstein Barr-Virus); FAISAL (1977), (Quarantänevirus) und FAISAL und AHNE (1980), (SVCV, IPNV).

Die Möglichkeit geringe zelluläre Antigenmengen mit der IPT nachzuweisen, liegt wahrscheinlich darin begründet, daß das Oxidationsprodukt des DAB große Polymere von unlöslichen, braunen, miteinander verbundenen Granula bildet. Die IPT hat gegenüber der IFT Vorteile:

- 1) die Verwendung eines einfachen Lichtmikroskopes,
- 2) die lange Lagerungsfähigkeit der Präparate ohne auszubleichen,
- 3) die bessere Erkennung der Gewebestrukturen.

Im Gegensatz zum SVCV (PFEIL, 1978; FAISAL und AHNE, 1980) findet man zahlreiche Arbeiten, die den IPNV- und VHSV-Nachweis mittels IFT beschreiben (GRAUBALLE, 1972; JØRGENSEN, 1972; 1974; JØRGENSEN und MEYLING, 1972; PIPER et al., 1973; TU et al., 1974; MEIER und JØRGENSEN, 1975).

Die Immunfluoreszenz SVCV-infizierter FHM-Zellen entsprach dem von PFEIL (1978) über das SVCV, von JØRGENSEN und MEYLING (1972) über das VHSV und von McALLISTER et al. (1974) über das IHN, beschriebenen Bild (staubförmige Verteilung der IF im Zytoplasma). Im Gegensatz hierzu traten bei der IPNV-Fluoreszenz massierte Antigenansammlungen (Granula) auf (PIPER et al., 1973).

3. Titration infizierter Karpfengewebe mit der IFT, IPT, Plaquemethode und im Mikrotitersystem

Diese Untersuchungen sind mit dem Ziel durchgeführt worden, eine schnelle und empfindliche Methode zur Quantifizierung des SVCV in Organsuspensionen zu finden und diese mit der Titrationmethode des SVCV zu vergleichen. Die

Ergebnisse zeigen, daß die IFT bzw. IPT wesentlich schnellere und empfindlichere Methoden als die Virustitration mit der Plaquemethode bzw. im Mikrotitersystem darstellen. Bereits 12 Stunden p.i. konnte man einen meßbaren Virustiter mit der IFT und IPT nicht aber mit der Plaque- bzw. Mikrotitermethode ermitteln. Ein großer Vorteil gegenüber der herkömmlichen Virusisolierung ist die serologische Spezifität der mit der IFT bzw. IPT ermittelten Befunde. 48 Stunden p.i. waren die mit der IFT bzw. IPT festgestellten Virustiter um ca. $2 \log_{10}$ höher als die mit Plaquemethode bzw. Mikrotitersystem festgestellten Titer. Das ist mutmaßlich darin begründet, daß mit der IFT bzw. IPT alle Viruspartikel, auch die defekten Viren, die keinen CPE bilden, erfaßt werden. 96 Stunden p.i. waren diese Unterschiede weitaus geringer. Die Abnahme der Anzahl der FB- bzw. PB-positiven Stellen ab 72 Stunden p.i. könnte damit zusammenhängen, daß diese Bezirke fusionierten.

In einem Vergleich zwischen der IFT-Titration, der Plaquemethode und der Röhrchentitrationmethode zur quantitativen Ermittlung eines zelladaptierten VHS-Virusstammes berichteten MEIER und JØRGENSEN (1975) über eine 10 - 100 fache Empfindlichkeit der IFT gegenüber den anderen Methoden. Wurde dagegen der Virusgehalt infizierter Fische untersucht, so waren die Titer der IFT und der Röhrchentitrationmethode gleich hoch, der Titer der Plaquemethode war dagegen geringfügig höher. Die Titration des IPNV mit der IFT wird als 3 mal empfindlicher gegenüber der Plaquemethode betrachtet (TU et al., 1974).

Die verwendeten Techniken der IF und IP sind für den SVCV-Nachweis vielversprechend, da sie neben der hohen Empfindlichkeit eine schnelle Diagnose erlauben.

In den vorliegenden Untersuchungen konnte der Erreger binnen 12 - 16 Stunden mit der IF- und IP-Methode nachgewiesen werden. Die Virusisolierung mit anschließender Neutralisation des Erregers dauerte dagegen 7 - 10 Tage.

Ein wesentliches Ergebnis dieser Untersuchung ist die Feststellung, daß der Erregernachweis mit der IFT bzw. der IPT bei infizierten Zellkulturen

- a) schneller als mit der Isolierungsmethode durchgeführt werden kann,
- b) die Befunde serotypspezifisch sind.

4. Blockierung der EPA in Fischgeweben

Obwohl die EPA in mehreren tierischen Geweben nachgewiesen worden sind (THEORELL, 1951), konnten einigen Viren ohne Blockierung solcher Aktivitäten mit der IPT erfolgreich festgestellt werden (ANDRE-THOMAS et al., 1974a; 1974b, (Polyoma-Myxomavirus); ATANASIU et al., 1974, (Tollwutvirus); DUBOIS-DALCQ et al., 1975, (SSPE); VAN POTTELSBERGHE et al., 1979, (Masernvirus); CARTHEW und SPARROW, 1980, (Sendaivirus).

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß für den SVCV-Nachweis in Karpfengeweben eine 20 minütige Behandlung der Präparate mit 0,1% H_2O_2 nach der antigenspezifischen Immunreaktion die besten Resultate bringt. Mit dieser Methode konnte eine völlige Inaktivierung der EPA in der Leber und in der Niere und eine überwiegende Blockierung in der Milz ohne Schädigung des Antigens erzielt werden. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen VAN DUIJN (1957), DOUGHERTY et al. (1974) und BANKS (1979). Nach STRAUS (1976) wird durch H_2O_2 die Peroxidase der Gewebe und die des Hämoglobins denaturiert.

Die Behandlung der Präparate mit Methanol zur Entfernung der EPA erwies sich als ungeeignet, da das SVCV-Antigen hierdurch geschädigt wurde. Diese schädigende Wirkung des Methanols ist auch bei anderen viralen bzw. nichtviralen Antigenen festgestellt worden (FINK, 1979; STRAUS, 1979).

Die Behandlung der Präparate mit NaN_3 , Phenylhydrazin HCl -Äthanol und Methanol- H_2O_2 (nach Ablauf der antigenspezifischen Immunreaktion) hatte dennoch eine teilweise

Schädigung des Antigens zur Folge. Die hier gemachten Beobachtungen, die im Gegensatz zu Berichten von TEUFEL et al. (1974); DESMOND et al. (1979) und FINK et al. (1979) stehen, könnten in der unterschiedlichen Struktur der untersuchten Antigene begründet sein.

5. Nachweis des SVCV-Antigens in Gefrierschnitten infizierter Karpfenorgane mit IFT und IPT

Die Untersuchungen lassen erkennen, daß mittels der IFT bzw. der IPT die Virusausbreitung in SVCV-infizierten Karpfen verfolgt werden kann. Beide Methoden erbrachten hinsichtlich der Verteilung des Antigens in den infizierten Organen ähnliche Ergebnisse.

Das Virus konnte nach einer experimentellen Infektion der Karpfen über das Wasser 7 Tage p.i. in den inneren Organen (Leber, Milz, Niere) nachgewiesen werden.

Die Befunde zeigten hinsichtlich der Verteilung des Antigens in den Organen (IF- bzw. IP-Intensität, Gehalt an infektiösen Viruspartikeln) eine zeitliche Abhängigkeit. So trat das SVCV bis zu 2 Wochen p.i. gehäuft in der Niere, danach in der Leber auf.

Nach den vorliegenden Ergebnissen wurde das SVCV-Antigen in den hämatopoetischen Geweben der Niere am häufigsten nachgewiesen, was in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von verschiedenen Autoren über Fischvirusinfektionen steht (YASUTAKE und RASMUSSEN, 1968 (VHS); WOLF et al., 1972 (CCVD); YASUTAKE, 1975 (IHN)).

Trotz positiver IF- bzw. IP-Befunde bei der Leber und Milz vom Fisch Nr. 9 konnte kein Virus isoliert werden, was auf die geringe Virusmenge in diesen Organen am Anfang der Infektion zurückzuführen ist. Zu der Beobachtung, daß ein positiver Virusantigennachweis trotz negativer Virusreisolierung möglich ist, kamen auch JØRGENSEN und MEYLING (1972), (VHSV) und PLUMB et al. (1981), (CCV).

In dem späten Stadium der Infektion (3 Wochen p.i.) wurde bei den Nieren der Fische Nr. 21, 23, 24 weder das Antigen noch das infektiöse Virus nachgewiesen, was mit der fortschreitenden Zerstörung der infizierten Zellen zusammenhängen kann. Nekrosen der hämatopoetischen Gewebe der Niere wurden bei Infektionen mit Rhabdoviren häufig beobachtet (YASUTAKE und RASMUSSEN, 1968; YASUTAKE, 1975; BOOTSMA, 1976 und AMLACHER et al., 1980).

In der Literatur ist das Bild der Immunofluoreszenz SVCV-infizierter Karpfengewebe noch nicht beschrieben worden. Es lassen sich aber gewisse Ähnlichkeiten mit der VHSV- bzw. IPNV-Fluoreszenz infizierter Gewebe erkennen (JØRGENSEN und MEYLING, 1972; HOFFMANN und WIZIGMANN, 1981; SWANSON, 1981).

Die mit der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse lassen erkennen, daß

- a) die IPT für die Routinediagnostik von SVCV-Infektionen geeignet ist,
- b) die IFT der IPT bei der SVCV-Antigen-ermittlung nicht überlegen ist.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Anwendung der IPT für die SVCV-Routinediagnostik. Weiterhin wurden die mit der IPT erarbeiteten Ergebnisse mit denen der IFT und mit der Virusisolierung verglichen.

Für den SVCV-Nachweis in FHM-Zellkulturen erwies sich die IPT gegenüber der IFT als schnellere und empfindlichere Methode, da bereits 2 Stunden p.i. das Virusantigen mit der IPT im Zytoplasma infizierter Zellen festgestellt werden konnte. Erst 4 Stunden später erhielt man die ersten positiven IFT-Befunde. Bis zu 12 Stunden p.i. war die Anzahl der Peroxidase-positiven Zellen größer als die der fluoreszierenden Zellen.

Für die quantitative Ermittlung des SVCV-Gehaltes in Organ-suspensionen infizierter Karpfen wurden 48 Stunden p.i. mit der IFT bzw. IPT um ca. $2 \log_{10}$ höhere Virustiter als mit der Plaquemethode bzw. im Mikrotitersystem festgestellt.

Zur Beseitigung der endogenen Peroxidaseaktivitäten in Karpfengewebegefrierschnitten erbrachte eine 20 minütige Behandlung der Präparate mit 0,1% H_2O_2 nach der Antigen-spezifischen Immunreaktion die besten Resultate, ohne daß das Antigen geschädigt wurde.

Für den SVCV-Nachweis in Gefrierschnitten infizierter Karpfengewebe ergaben die IFT und die IPT hinsichtlich der Intensität der Reaktion sowie der Ermittlung des Antigens in den infizierten Organen ähnliche Ergebnisse. Das SVCV-Antigen konnte bis zu 2 Wochen p.i. in den hämatopoetischen Geweben der Niere am häufigsten nachgewiesen werden.

Nach den vorliegenden Ergebnissen ist die IPT eine schnelle und zuverlässige Methode für den SVCV-Antigennachweis.

VI. SUMMARY

Studies on the detection of Spring Viremia of Carp Virus in cell culture and organs of carp with the immunoperoxidase and the immunofluorescence techniques

This work deals with the application of the immunoperoxidase technic (IPT) in the routine diagnosis of Spring Viremia of Carp Virus (SVCV). The results obtained with IPT have been compared with those obtained by the immunofluorescence technic (IFT) and with the virus isolation.

For the detection of SVCV in FHM cell culture the IPT was quicker and more sensitive than the IFT. The viral antigen could be detected 2 hours p.i. with the IPT, whereas the first positive fluorescence was found 6 hours p.i. With the progress of infection (12 hours p.i.) the number of IP-positive cells was greater than those detected by the IFT.

Concerning the quantification of SVCV in organs of infected carp, it has been found that the titers obtained by IFT and IPT were about $2 \log_{10}$ above those obtained with the plaque method and with the microtiter system.

The endogenous peroxidase activities in the organs of carp have been successfully removed without inactivation of the antigen using 0,1% H_2O_2 after the antigen specific immune reaction.

The results obtained with the IPT and IFT for the detection of SVCV in frozen sections of infected carp tissue were similar in view of the intensity of the reaction as well as in the identification of the antigen in infected organs. The SVCV could be detected most often in the hematopoietic tissue of the kidney till two weeks p.i.

In conclusion, it could be stated that the IPT is a rapid and specific method for the detection of SVCV in cell cultures as well as in sections of organs of infected carp.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

- ABELSON, H.T., G.H. SMITH, H.A. HOFFMAN und W.P. ROWE (1969):
Use of enzyme labeled antibody for electron microscopic
localization of lymphocytic choriomeningitis virus
antigen in infected cell culture.
J.Nat.Cancer Inst. 42, 497-515.
- AHNE, W. (1973): Zellkulturen aus verschiedenen Süßwasser-
teleosteergewebe und Untersuchungen über die Ätiologie
der Schwimmblasenentzündung der Karpfen.
Rer. nat.Diss., München.
- AHNE, W. (1978a): Studies on uptake and multiplication of
Spring viremia of carp virus in carp (Cyprinus carpio).
J.Fish Dis. 1, 265-268.
- AHNE, W. (1978b): Laboratoriumsdiagnostik fischpathogener
Viren.
Tierärztl. Umschau 11, 584-594.
- AHNE, W. (1979): Untersuchungen über die akute Form der
infektiösen Bauchwassersucht bei Cypriniden (Cyprinus
carpio, Ctenopharyngodon idella).
Vet.-med. Habilitationsschrift, München.
- AHNE, W. (1980): Rhabdovirus carpio-Infektion beim Karpfen
(Cyprinus carpio): Untersuchungen über Reaktionen
des Wirtsorganismus.
Fortschritt der Veterinärmedizin 30, 180-183.
- AHNE, W. (1981): Serological techniques currently used in
fish virology.
International Symposium on Fish Biologics: Sero-
diagnostics and Vaccines, Leetown, W. Va., U.S.A.
Develop.biol.Standard. 49, 3-27.
S.Karger, Basel.

- AHNE, W. und K. WOLF (1980): Viruserkrankungen der Fische.
In: Krankheiten und Schädigungen der Fische, 2. Auflage, Herausgeb. H.H. Reichenbach-Klinke, S. 56-105.
Fischer Verlag, Stuttgart.
- AMEND, D.F. und L. SMITH (1974): Pathophysiology of infectious hematopoietic necrosis virus disease in rainbow trout (Salmo gairdneri): early changes in blood and aspects of the immune response after injection of IHN virus.
J.Fish.Res.Board Can. 31, 1371-1375.
- AMLACHER, E., J. UDE, C. RUDOLPH und G. ERNST (1980):
Direct electron microscopical visualization of the presumptive virus of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in the rainbow trout (Salmo gairdneri Richardson) and additional histopathological and haematological observations.
J. Fish Dis. 3, 55-62.
- ANDRE-THOMAS, J., S. GARZON, C. LAMBRE, E. HOLLANDE, M. HENRY, C. KURSTAK und E. KURSTAK (1974a): Study on the localization by immunoperoxidase of the antigen of the mammary tumor virus during the in vivo and in vitro evolution of the cell line T III.
In: Viral Immunodiagnosis, Herausgeb. E. Kurstak und R. Morisset, S. 41-60.
Academic Press, New York - London.
- ANDRE-THOMAS, J., C. LAMBRE, S. GARZON, E. HOLLANDE und M. HENRY (1974b): Study on the localization of viral antigens in myxomatosis by the immunoperoxidase technique: light and electron microscopic analysis.
In: Viral Immunodiagnosis, Herausgeb. E. Kurstak und R. Morisset, S. 61-75.
Academic Press, New York - London.
- APPEL, M. (1969): Pathogenesis of canine distemper.
Amer.J.Vet.Res. 30, 1167-1182.

- ATANASIU, P., P. DRAGONAS, H. TSIANG und A. HARBI (1971):
Immunoperoxidase. Nouvelle technique spécifique de
mise en évidence de l'antigène rabique intra et
extra-cellulaire en microscopie optique.
Ann.Inst.Pasteur 121, 247-250
- ATANASIU, P., P. PERRIN, S. FAVRE, G. CHEVALLIER und H.
TSIANG (1974): Immunofluorescence and immunoperoxidase
in the diagnosis of rabies.
In: Viral Immunodiagnosis, Herausgeb. E. Kurstak und
R. Morisset, S. 141-155.
Academic Press, New York - London.
- AVRAMEAS, S. und J. URIEL (1966): Méthode de marquage d'
antigènes et d'anticorps avec des enzymes et son
application en immunodiffusion.
C.R.Acad.Sci. Paris 262, 2543-2546.
- BACHMANN, P.A. und W. AHNE (1973): Isolation and character-
ization of agent causing swim-bladder inflammation
in carp.
Nature (Lond.) 244, 235-237.
- BANKS, P.M. (1979): Diagnostic applications of an immuno-
peroxidase method in hematopathology.
J.Histochem.Cytochem. 27, 1192-1194.
- BAUDOUY, A.M. (1975): Virémie Printanière de la Carpe:
premiers isolements du virus en France.
Bull.Off.Int.Epizoot. 83, 717-722.
- BAUDOUY, A.M. (1978): Relation hôte-virus au cours de la
Virémie Printanière de la Carpe.
C.R.Acad.Sci. Paris 286, 1225-1228.

- BAUDOUY, A.M., M. DANTON und G. MERLE (1980a): Experimental infection of susceptible carp fingerlings with Spring viraemia of carp virus, under wintering environmental conditions.
In: Fish Diseases, third COPRAQ-Session, Herausgeb. W. Ahne, S. 23-27.
Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York.
- BAUDOUY, A.M., M. DANTON und G. MERLE (1980b): Virémie Printanière de la Carpe: résultats de Contamination effectuées au printemps.
Ann.Rech.Vet. 11, 245-249.
- BECKER, W., P. TEUFEL und W. MIELDS (1974): Die Immunoperoxidase-Methode zum Nachweis von Virus- und Chlamydien-Antigenen. III. Nachweis von TGE-Virus-Antigen in Schweineschilddrüsenzellkulturen.
Zbl.Vet.Med.B 21, 59-65
- BELLON, B., C. SAPIN und P. DRUET (1975): Comparaison de la sensibilité des techniques d'immunofluorescence et d'immunoperoxydase en méthodes directe et indirecte.
Ann.Immunol. 126C, 15-22.
- BERGMEYER, H.U. (1970): Methoden der enzymatischen Analyse, 2. Auflage.
Verlag-Chemie, Weinheim.
- BISHOP, D.H.L. und M.S. SMITH (1977): Rhabdoviruses.
In: The molecular biology of animal viruses, Herausgeb. D.P. Nayak, S. 167-180.
Marcel Dekker Inc., New York - Basel.

- BOORSMA, D.M., J.G. STREEFKERK und N. KORNS (1976):
Peroxidase and fluoresceinisoithiocyanate as antibody
markers. A quantitative comparison of two peroxidase
conjugates prepared with glutaraldehyde or periodate
and a fluorescein conjugate.
J.Histochem.Cytochem. 24, 1017-1021.
- BOOTSMA, R. (1976): Studies on two infectious diseases of
cultured freshwater fish.
Rhabdovirus diseases of pike fry, Esox lucius L.
Columnaris disease of carp, Cyprinus carpio L.
Vet.-med.Diss. Utrecht.
- BOOTSMA, R. und C.J.A.H.V. van VORSTENBOSCH (1973):
Detection of a bullet shaped virus in kidney sections
of pike fry (Esox lucius L.) with red disease.
Neth.J.Vet.Sci. 28, 86-90.
- BUCKE, D. und J. FINLAY (1979): Identification of Spring
viraemia in carp (Cyprinus carpio L.).
Vet.Rec. 104, 69-71.
- CARTHEW, P. und S. SPARROW (1980): A comparison in germ
free mice of the pathogenesis of Sendai virus and
Mouse pneumonia virus infections.
J.Pathol. 130, 153-158.
- CARTWRIGHT, B., C.J. SMALE und F. BROWN (1970): Dissection
of vesicular stomatitis virus into the infective
ribonucleoprotein and immunizing compnents.
J.gen.Virol. 7, 19-32.
- CHEVILLE, N.F. und W.L. MENGELING (1969): The pathogenesis
of chronic hog cholera (swine fever). Histologic,
immunofluorescent and electron microscopic studies.
Lab.Invest. 20, 261-274.

- CLERX, J.P.M., M.C. HORZINEK und A.D.M.E. OSTERHAUS (1978):
Neutralization and enhancement of infectivity of
non-salmonid fish rhabdoviruses by rabbit and pike
immune sera.
J.gen.Virol. 40, 297-308.
- COONS, A.H. und M.M. KAPLAN (1950): Localization of antigen
in tissue cells. II. Improvement in method for
detection of antigen by means of fluorescent antibody.
J.exp.Med. 91, 1-13.
- DESMOND, E.P., N.J. SCHMIDT und E.H. LENNETTE (1979):
Immunoperoxidase staining for detection of Colorado
tick fever virus and a study of congenital infection
in the mouse.
Am.J.Trop.Med.Hyg. 28, 729-732.
- DORSON, M. und C. TORCHY (1979): Complement dependent
neutralization of Egtved virus by trout antibodies.
J.Fish Dis. 2, 345-347.
- DOUGHERTY, R.M., A.A. MARUCCI und H.S. DISTEFANO (1972):
Application of immunohistochemistry to study of
avian leukosis virus.
J.gen.Virol. 15, 149-162.
- DOUGHERTY, R.M., H.S. DISTEFANO und A.A. MARUCCI (1974):
Application of antigen antibody complexes to the
immunohistochemical study of avian leukosis virus
antigens.
In: Viral Immunodiagnosis, Herausgeb. E. Kurstak und
R. Morisset, S. 89-99.
Academic Press, New York - London
- DUBOIS-DALCQ, M., K. WORTHINGTON, O. GUTENSON und L.H.
BARBOSA (1975): Immunoperoxidase labelling of
subacute sclerosing panencephalitis virus in hamster
acute encephalitis.
Lab.Invest. 32, 518-526.

- DUIJN, van P. (1957): Histochemistry of dopa factors.
III. Inactivation experiments on the dopa factor
in neutrophilic and eosinophilic leucocytes and
erythrocytes.
Acta Physiol.Pharmacol.Neerl. 5, 428.
- EAGLE, H. (1959): Amino acid metabolism in mammalian
cell culture.
Science, 130, 432.
- ELLIS, A.E. (1978): The immunology of teleosts.
In: Fish Pathology, Herausgeb. R.J. Roberts,
S. 92-104.
Bailliere Tindall, London.
- ENZMANN, P.J. (1980): Diagnosis of VHS virus after acute
and chronic infection of rainbow trout.
Second International Symposium of Veterinary
Laboratory Diagnosticians, Lucerne, Switzerland.
- ENZMANN, P.J. (1981): Rapid identification of VHS virus
from trout by immunofluorescence.
International Symposium on Fish Biologics: Sero-
diagnostics and Vaccines, Leetown, W. Va., U.S.A.
Develop.biol.Standard. 49, 57-62.
S.Karger, Basel.
- ESPMARK, J.A., M. GRANDIEN und N.R. BERGQUIST (1971):
Quantitative evaluation of direct and indirect
immunofluorescence test for viral antigen.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 177, 98-105.
- FAISAL, M. (1977): Studies on some biological properties
of the Quarantil virus.
Vet.-med.Master thesis , Kairo.

- FAISAL, M. und W. AHNE (1980): Use of immunoperoxidase-technique for detection of fish virus antigens.
In: Fish Diseases, third COPRAQ-Session, Herausgeb.
W. Ahne, S. 186-192.
Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York.
- FERGUSON, H.W. (1976): The relationship between ellipsoids and melanomacrophages centers in the spleen of turbot (Salmo Scophthalmus maximus).
J.Comp.Path. 86, 377-380.
- FIJAN, N. (1976): Diseases of cyprinids in Europe.
Fish Pathology 10, 129-134.,
- FIJAN, N. (1978): Frühlingsvirämie der Karpfen. Ätiologie, Vorkommen und Bekämpfung.
DVG, Fachgruppe: Tierseuchenrecht, 92-100.
- FIJAN, N. und Z. MATAŠIN (1980): Spring viraemia of carp: preliminary experiments on vaccination by exposure to virus in water.
Vet.Arh. (Zagreb) 50, 215-220.
- FIJAN, N., Z. PETRINEC, D. SULIMANOVIC und L.O. ZWILLENBERG (1971): Isolation of the viral causative agent from the acute form of infectious dropsy of carp.
Vet.Arh. (Zagreb) 41, 125-138.
- FIJAN, N., Z. PETRINEC, Z. STANCL, M. DORSON und M. Le BERRE (1977): Hyperimmunization of carp with Rhabdovirus carpio.
Bull.Off.Int.Epizoot. 87, 439-440.
- FINK, B., E. LOEPPE und R. WYLER (1979): Demonstration of viral antigen in cryostat sections by a new immunoperoxidase procedure eliminating endogenous peroxidase activity.
J.Histochem.Cytochem. 27, 686-688.

- FISCHMANN, H.R. und M. SCHAEFFER (1971): Pathogenesis of experimental rabies as revealed by immunofluorescence. Ann.N.Y.Acad.Sci. 177, 78-84.
- GARDNER, P.S., M. GRANDIEN und J. Mc QUILLIN (1978): Comparison of immunofluorescence and immunoperoxidase methods for viral diagnosis at a distance: a WHO collaborative study. Bulletin of the World Health Organisation 55, 105-110.
- GERBER, M.A., K.V. SHAH, S.N. THUNG und G.M. ZU RHEIN (1980): Immunohistochemical demonstration of common antigen of polyomaviruses in routine histologic tissue sections of animals and man. Am.J.Clin.Pathol. 73, 794-797.
- GHITTINO, P., E. BECCARIA und A. FERRARI (1980): Casa di ascite infettiva della Carpa modernamente diagnosticata anche in Italia. Riv.It.Piscis.Ittiop.A XV, 1-4.
- GRAHAM, R.C. und M.J. KARNOVSKY (1966): The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultra-structural cytochemistry by a new method. J.Histochem.Cytochem. 4, 291-301.
- GRAUBALLE, C. (1972): Infektious pankreas-nekrose. En ny virussygdom i Danmark hos Laksefisk. Diagnostiske og aetiologiske undersøgelser. Licentiatafhandling. Kongelige Vet.-og. Landbohøjskole København.
- GRAVELL, M. und R.G. MALSBERGER (1965): A permanent cell line from the Fathead Minnow (Pimephales promelas). Ann.N.Y.Acad.Sci. 126, 555-565.

- HABASHI, Y., H.J. SCHLOTTFELDT und J.W. FROST (1975):
Production of antisera against the virus of viral
haemorrhagic septicaemia (VHS) of rainbow trout.
Zbl.Vet.Med.B 22, 666-672.
- HILL, B.J., B.O. UNDERWOOD, C.J. SMALE und F. BROWN (1975):
Physico-chemical and serological characterization
of five rhabdovirus infecting fish.
J.gen.Virol. 27, 369-378.
- HILL, B.J., R.F. WILLIAMS und J. FINLAY (1981): Preparation
of antisera against fish virus disease agents.
International Symposium on Fish Biologics: Sero-
diagnostics and Vaccines, Leetown, W. Va., U.S.A.
Develop.biol.Standard. 49, 209-218.
- HOFFMANN, R. und G. WIZIGMANN (1981): Comparative histological
and immunohistological studies on VHS.
Fourth Session of EIFAC (FAO)/OIE. Cooperative
Programme of Research on Aquaculture (COPRAQ).
Cadiz, Spanien.
- HUANG, S.M. und A.R. NEURATH (1979): Immunohistologic
demonstration of hepatitis B viral antigens in
liver with reference to it's significance in liver
injury.
Lab.Invest. 40, 1-17.
- JENSEN, N.J., B. BLOCH und J.L. LARSEN (1979): The Ulcus
syndrome in cod (Gadus morhua). III. A preliminary
virological report.
Nord.Vet.Med. 31, 436-442.

- JØRGENSEN, P.E.V. (1972): Egtvedvirus: antigenic variation in 76 virus isolates examined in neutralization tests and by means of the fluorescent antibody technique.
Symp.Zool.Soc.Lond. 30, 333-340.
- JØRGENSEN, P.E.V. (1974): Indirect fluorescent antibody technique for demonstration of trout viruses and corresponding antibody.
Acta vet.Scand. 15, 198-205.
- JØRGENSEN, P.E.V. (1982): Egtved virus: temperature-dependent immune response of trout to infection with low virulence virus.
J.Fish Dis. 5, 47-55.
- JØRGENSEN, P.E.V. und A. MEYLING (1972): Egtved virus: demonstration of virus antigen by the fluorescent antibody technique in tissue of rainbow trout affected by viral hemorrhagic septicemia and in cell cultures infected with Egtved virus.
Arch.ges.Virusforsch. 36, 115-122.
- KÄRBER, G. (1931): Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche.
Naunyn-Schmiedebergs Arch.Exp.Pathol.Pharmakologie 162, 480-483.
- KANG, C.Y. und L. PREVEC (1970): Proteins of vesicular stomatitis virus. II. Immunological comparisons of viral antigens.
J.Virol. 6, 20-27.
- KAWAMURA, A.J.R. (1974): Fluorescent Antibody Techniques and their Applications.
University of Tokyo Press, Tokyo and University Park Press, Baltimore - London - Tokyo.

KEKWICK, R.A. (1940): The serum protein in multiple myelomatosis.

Biochem.J. 34, 1248-1257.

KELLEY, J.M., S.U. EMERSON und R.R. WAGNER (1972): The Glycoprotein of vesicular stomatitis virus is the antigen that gives rise to and reacts with neutralizing antibody.

J.Virol. 6, 1231-1235.

KINKELIN, de P. und M. Le BERRE (1977): Isolement d'un rhabdovirus pathogène de la truite Fario (Salmo trutta, L. 1766).

C.R.Acad.Sci. Paris 284, 101-104.

KINKELIN, de P., B. GALIMARD und R. BOOTSMA (1973): Isolation and identification of the causative organism of "Red Disease" of pike (Esox lucius L. 1766).

Nature 241, 465-467.

KÖLBL, O. (1975): Neue Erkenntnisse über die Bauchwassersucht bei Karpfen.

Österr.Fischerei 28, 69-72.

KÖLBL, O. und E. KAINZ (1977): Die Verbreitung des Erregers der infektiösen Bauchwassersucht bzw. der Frühlingsvirämie in den österreichischen Karpfenteichwirtschaften.

Österr.Fischerei 30, 80-83.

KURSTAK, E. (1971): The immunoperoxidase technique: localization of viral antigens in cells.

In: Methods in Virology, Herausgeb. K. Maramorosch und H. Koprowski, Vol.V, S. 423-444.

Academic Press, New York.

- KURSTAK, E., J.R. CÔTE und S. BELLONCIK (1969): Etude de la synthèse et de la localisation des antigènes de virus de la denso nucléose à l'aide d'anticorps conjugués à l'enzyme peroxydase (nouvelle méthode d'immunoperoxydase).
C.R.Acad.Sci. Paris 268, 1209-2312.
- LEDUC, E.H., R. WICKER, S. AVRAMEAS und S. BERNHARD (1969): Ultrastructural localization of SV₄₀ T antigen with enzyme-labelled antibody.
J.gen.Virol. 4, 609-614.
- MALSBERGER, R.G. und G. LAUTENSLAGER (1980): Fish viruses: Rhabdovirus isolated from a species of the family Cichlidae.
Fish Health News 9, 1-2.
- MAYR, A., P.A. BACHMANN, B. BIBRACK und G. WITTMANN (1974): Virologische Arbeitsmethoden, Band I.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- MAYR, A., P.A. BACHMANN, B. BIBRACK und G. WITTMANN (1977): Virologische Arbeitsmethoden, Band II.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- McALLISTER, P.E., J.L. FRYER und K.S. PILCHER (1974): Further characterization of infectious hematopoietic necrosis virus of salmonid fish (Oregon strain).
Arch.ges.Virusforsch. 44, 270-279.
- MEIER, W. und P.E.V. JØRGENSEN (1975): A rapid and specific method for the diagnosis of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) of rainbow trout.
Riv.It.Piscis. Ittiop. A X, 11-18.

- MERKEL, K.H.H. und M. ZIMMER (1981): Herpes simplex encephalitis. A modified indirect immunoperoxidase technique for a rapid diagnosis in paraffin-embedded tissue.
Arch.Pathol.Lab.Med. 105, 351-352.
- MORISSET, R., C. KURSTAK und E. KURSTAK (1974): Diagnosis of Herpes simplex virus infections with immunoperoxidase.
In: Viral Immunodiagnosis, Herausgeb. E. Kurstak und R. Morisset, S. 31-39.
Academic Press, New York - London.
- NAGABAYASHI, T., K. WOLF, D.P. ANDERSON und M.C. QUIMBY (1975): Characterization of EV-1, a new virus isolated from the eel (Anguilla anguilla).
Abstract ASM-annual meeting. Atlantic city, U.S.A.
- NAKANE, P.K. und G.B. PIERCE (1966): Enzyme labeled antibodies: preparation and application for the localization of antigens.
J.Histochem.Cytochem. 14, 929-931.
- NAKANE, P.K. und G.B. PIERCE (1967): Enzyme labeled antibodies for the light and electron microscopic localization of tissue antigens.
J.Cell Biol. 33, 307-318.
- NAKANE, P.K. und A. KAWAOI (1974): Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation.
J.Histochem.Cytochem. 22, 1084-1091.
- NEGELE, R.D. (1977): Histopathological changes in some organs of experimentally infected carp fingerlings with Rhabdovirus carpio.
Bull.Off.Epizoot. 87, 449-450.

- NICHOLSON, B.L. und E.A. HENCHAL (1978): Rapid identification of pancreatic necrosis virus in infected cell cultures by immunoperoxidase techniques.
J.Wildlife Diseases 14, 465-469.
- NICHOLSON, B.L. und S. POCHEBIT (1981): Antigenic analysis of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) by neutralization kinetics.
International Symposium on Fish Biologics: Sero-diagnostics and Vaccines, Leetown, W. Va., U.S.A.
Develop.biol.Standard. 49, 35-42.
S.Karger, Basel.
- PFEIL, C. (1978): Modell der Schnelldiagnose einer Infektion mit dem Rhabdovirus carpio durch die indirekte Immunofluoreszenz.
Fisch und Umwelt 5, 18-19.
- PFEIL-PUTZIEN, C. und C. BAATH (1978): Nachweis einer Rhabdovirus-carpio-Infektion bei Karpfen im Herbst.
Berl.Münch.Tierärztl.Wschr. 91, 445-447.
- PIPER, D., B.L. NICHOLSON und J. DUNN (1973): Immuno-fluorescence study of the replication of infectious pancreatic necrosis virus in trout and Atlantic cell culture.
Infect.Immun. 8, 249-254.
- PLUMB, J.A. und P.R. BOWSER (1978): Recent development in channel catfish virus research.
Marine Fisheries Review 40, 12-13.

PLUMB, J.A., R.L. THUNE und P.H. KLESIUS (1981): Detection of channel catfish virus in adult fish.

International Symposium of Fish Biologics: Sero-diagnostics and Vaccines, Leetown, W. Va., U.S.A. Develop.biol.Standard. 49, 29-34.
S.Karger, Basel.

POTTELSBERGHE, van C., K.W. RAMMOHAN, H.F. McFARLAND und M. DUBOIS-DALCQ (1979): Selective neuronal, dendritic and postsynaptic localization of viral antigen in measles-infected mice.
Lab.Invest. 40, 99-108.

PRESSMAN, D., Y. YAGI und R. HIRAMATO (1958): A comparison of fluorescein and I^{131} as labels for determining the in vivo localization of antitissue antibodies.
Int.Arch.Allergy 12, 125-136.

RAM, J.S., P.K. NAKANE, D.G. RAWLINSON und G.B. PIERCE (1966): Enzyme-labelled antibodies for ultrastructural studies.
Fed.Proc. 25, 732.

REDA, I.M. (1964): Studien über die Vermehrung der Newcastle disease Virus. Verhalten der virusspezifischen Komponenten in verschiedenen Arten von Gewebekulturzellen.
Vet.-med.Diss. Gießen.

REDA, I.M., R. ROTT und W. SCHÄFER (1964): Fluorescent antibody studies with NDV infected cell system.
Virology 22, 422-425.

ROBERTS, R.J. (1975): Melanin containing cells of teleost fish and their relation to disease.
In: The Pathology of Fishes, Herausgeb. W.E. Ribelin und G. Migaki, S. 399-428.
University of Wisconsin Press, Madison.

- ROSZKOWSKI, J., M. BARTOSZCZE, J. ZADURA und Z. SWIATEK (1978): Use of immunoenzyme technique for the detection of Aujeszky's disease virus in cell culture.
Vet.Rec. 102, 462-463.
- ROUDIKOV, N.J., L.I. GRISHENKO und K.A. LOBUNCOV (1975):
Vesennaja virusnaja boleznj ryb.
Vses.ord.Lenina inst.eksp.vet. 20, 16-19.
- SCHNEIDER, L.G. (1964): Erfahrung mit fluorchrommarkierten Antikörpern bei der routinemäßigen Laboratoriumsdiagnose der Tollwut.
I. Mitteilung: Die fluoreszierende Antikörpertechnik.
Zbl.Vet.Med.B 11, 207-230.
- STANKIEWICZ, E.B. (1977): Neuropathological picture in fish affected by Carp septicaemia (Septicaemia haemorrhagica Cyprinorum).
Acta Icthyologica et Piscatoria 7, 35-45.
- STEPHANS, R., K. TRAU, P. GAUDREAU, J. YEH, L. FISHER und S.A. MAYYUSI (1976): Comparative studies on EBV antigens by immunofluorescence and immunoperoxidase techniques.
Int.J.Cancer 19, 305-316.
- STERNBERGER, L.A. (1979): Immunocytochemistry, 2. Auflage.
John Wiley Publication, New York.
- STERNBERGER, L.A., P.H. HARDY, J.J. CUCULIS und H.G. MEYER (1970): The unlabeled antibody enzyme method of immunochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody-complex (horseradish-peroxidase-antihorseradish-peroxidase) and its use in identification of spirochetes.
J.Histochem.Cytochem. 18, 315-333

- STRAUS, W. (1971): Inhibition of peroxidase by methanol and by methanol-nitroferricyanide for use in immunoperoxidase procedures.
J.Histochem.Cytochem. 19, 682-688.
- STRAUS, W. (1972): Phenylhydrazine as inhibitor of horseradish peroxidase for use in immunoperoxidase procedures.
J.Histochem.Cytochem. 20, 949-951.
- STRAUS, W. (1976): Use of peroxidase inhibitors for immunoperoxidase procedure.
First International Symposium on Immunoenzymatic Techniques, Herausgeb. G. Feldman, P. Druet, J. Brington und S. Avrameas, S. 117-124.
North-Holland Publishing Company.
- STRAUS, W. (1979): Peroxidase procedures. Technical problems encountered during their application.
J.Histochem.Cytochem. 27, 1349-1351.
- STREEFKERK, J.G. (1972): Inhibition of erythrocyte pseudoperoxidase activity by treatment with hydrogen peroxide following methanol.
J.Histochem.Cytochem. 20, 829-831.
- SUTMOLLER, P. und K.M. COWAN (1974): The detection of foot and mouth disease virus antigens in infected cell cultures by immunoperoxidase-techniques.
J.gen.Virol. 22, 287-291.
- SWANSON, R.N. (1981): Use of the indirect fluorescent antibody test to study the pathogenesis of infectious pancreatic necrosis virus infection in trout.
International Symposium on Fish Biologics: Sero-diagnostics and Vaccines, Leetown, W. Va., U.S.A.
Develop.biol.Standard. 49, 71-78.
S.Karger, Basel.

SWANSON, R.N. und J.H. GILLESPIE (1981): An indirect fluorescent antibody test for the rapid detection of infectious pancreatic necrosis virus in tissues. J.Fish Dis. 4, 309-315.

TESARCIK, J., B. MACURA, L. DEDEK, L. VALICEK und B. SMID (1977): Isolation and electron microscopy of a Rhabdovirus from the acute form of infectious dropsy of carp (Spring viraemia of carp). Zbl.Vet.Med.B 24, 340-343.

TEUFEL, P., W. MIELDS und W. BECKER (1974): Die Immunoperoxidase-Methode zum Nachweis von Virus- und Chlamydien-Antigenen. I. Methodische Grundlagen und Nachweis von Herpesvirus equi-1-Antigenen in Lebern infizierter Goldhamster. Zbl.Vet.Med.B 21, 37.47.

THEORELL, H. (1951): The iron-containing enzymes. B. Catalases and peroxidases. In: The Enzymes Vol. II, Herausgeb. J.B. Sumner und K. Myrbach, S. 319. Academic Press, New York.

TU, K.C., R.S. SPENDLOVE und R.W. GOEDE (1974): Immunofluorescent cell assay of infectious pancreatic necrosis virus. Appl.Microbiol. 27, 593-599.

UNDERWOOD, B.O., C.J. SMALE, F. BROWN und B.J. HILL (1977): Relationship of a virus from Tellina tenuis of infectious pancreatic necrosis virus. J.gen.Virol. 36, 93-109.

- WEIR, E.E., T.G. PRETLOW, A. PITTS und E.E. WILLIAMS (1974): Destruction of endogenous peroxidase activity in order to locate cellular antigens by peroxidase-labeled antibodies. J.Histochem.Cytochem. 22, 51-54.
- WHO (1978): Progress in the rapid diagnosis of viral infections: a Memorandum. Bulletin of the World Health Organization 56, 241-244.
- WICKER, R. und S. AVRAMEAS (1969): Localization of virus antigens by enzyme labelled antibody. J.gen.Virol. 4, 465-471.
- WIZIGMANN, G., C. PFEIL-PUTZIEN, C. BAATH, H. DANGSCHAT und G. KÖPPEL (1980): Serologische Untersuchungen über das Vorkommen von Antikörpern gegenüber Rhabdovirus carpio bei Karpfen in bayerischen Teichwirtschaften. Fisch und Umwelt 8, 31-36.
- WOLF, K., R.L. HERMAN und C.P. CARLSON (1972): Fish viruses: Histopathologic changes associated with experimental channel catfish virus disease. J.Fish.Res.Board Can. 29, 149-150.
- YASUTAKE, W.T. (1975): Fish viral diseases: clinical, histological and comparative aspects. In: The Pathology of Fishes, Herausgeb. W.E. Ribelin und G. Migaki, S. 247-274. University of Wisconsin Press, Madison.
- YASUTAKE, W.T. und C.J. RASMUSSEN (1968): Histopathogenesis of experimentally induced viral haemorrhagic septicaemia in fingerling rainbow trout (Salmo gairdneri). Symp.Off.int.Epizoot. 41, 1-7.

Herrn Prof. Dr. M. Ruf und Herrn Prof. Dr. Reichenbach-Klinke möchte ich an dieser Stelle für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes danken.

Besonders bedanke ich mich bei Herrn P.D. Dr. W. Ahne für seinen jederzeit gewährten Rat und die bereitwillige Unterstützung der Arbeit. Das dabei entstandene gute Arbeitsklima trug wesentlich zur Vollendung der Arbeit bei.

Herrn Prof. Dr. G. Wizigmann, Tiergesundheitsdienst Bayern e.V., Grub, bin ich für die wertvollen Ratschläge bei der Durchführung der Immunofluoreszenz sehr verbunden.

Frau A. Weiler und Fräulein C. Held sowie allen Mitarbeitern des Institutes für Zoologie und Hydrobiologie, die zum Zustandekommen dieser Arbeit beigetragen haben, danke ich herzlich.

LEBENS LAUF

Name: Abdelkariem - Hussein

Vorname: Mohamed Faisal

Familienstand: verheiratet seit September 1977 mit
Frau Dr. Iman geb. Wasfi

18.09.1952: Geboren als Sohn des Lehrers Abdelkariem
Hussein und dessen Ehefrau Atyat geb,
Mounib in Kairo (Ägypten)

1958 - 1962: Besuch der Volksschule in Kairo

1962 - 1968: Besuch der Oberschule in Kairo

1968 : Abitur

1968 - 1973: Studium der Veterinärmedizin an der
Universität Kairo

1973 : Erlangung des Grades eines Bachelor
(B.V.SC.)

März 1977 : Erlangung des Grades eines Master
(M.V.SC.)

Dezember 1973 -
Oktober 1977: Wissenschaftlicher Assistent am
Mikrobiologischen Institut der Tierärztlichen
Fakultät der Universität Kairo

Oktober 1977 -
April 1978 : Goethe-Institut Blaubeuren zur Vervollständigung
der deutschen Sprache

April 1978 -
Oktober 1978: Deutschkurs für Ausländer an der Universität
München

Seit Oktober 1978: Doktorand am Institut für Zoologie und
Hydrobiologie der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München zur Anfertigung der
Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen
Doktorwürde und zur Ausbildung zum
Fachtierarzt für Fische

